



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

του Τμήματος Βιοχημείας και

Βιοτεχνολογίας

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Ανάπτυξη μιας Stem Loop Mediated Reverse
Transcription PCR για τον εντοπισμό αντιγραφικά
ενεργών εντεροϊών παρουσία υψηλής
συγκέντρωσης μη αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών

Σκαρλή Ελένη

Λάρισα 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ.ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ανάπτυξη μιας Stem Loop Mediated Reverse Transcription PCR για τον εντοπισμό
αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών παρουσία υψηλής συγκέντρωσης μη αντιγραφικά
ενεργών εντεροϊών

A Stem Loop Mediated Reverse Transcription PCR for the detection of actively
replicating Enteroviruses in the presence of a high concentration of inactivated
Enteroviruses

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, από τον Ιούλιο του 2017 έως τον Ιούνιο του 2018.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνση του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της Μεταπτυχιακής Διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο , που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Δάσκου Μαρία και τον διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο για την ανεκτίμητη βοήθεια και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν στο εργαστήριο καθ'όλη τη διάρκεια της Μεταπτυχιακής μου Διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae* και στο γένος των εντεροϊών. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και μία 3'αμετάφραστη περιοχή που καταλήγει σε πολύ(Α)-ουρά. Οι περισσότερες μολύνσεις με εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές, αλλά σε ένα ποσοστό οδηγούν στην εμφάνιση πιο σοβαρών ασθενειών όπως η άσηπτη μηνιγγίτιδα και η παραλυτική πολιομυελίτιδα.

Κύριος αιτιολογικός παράγοντας για τη διάγνωση των εντεροϊών αποτελεί η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Όπως προαναφέρθηκε όμως, οι εντεροϊοί συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Έτσι, μπορούν να κυκλοφορούν αθόρυβα μέσα σε έναν πληθυσμό με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος για πιθανές εξάρσεις. Ωστόσο η ύπαρξη απλά του γονιδιώματος ενός εντεροϊού δεν σημαίνει απαραίτητα και την ενεργότητά του, για αυτό κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη μίας μεθόδου που να μπορεί να διακρίνει τους ενεργούς εντεροϊούς από τους μη ενεργούς εντεροϊούς.

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μία Stem Loop Mediated Reverse Transcription PCR για τον εντοπισμό αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών παρουσία υψηλής συγκέντρωσης μη αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών, χρησιμοποιώντας ως ενεργό ιό το εμβολιακό στέλεχος Sabin1 χαμηλής συγκέντρωσης και ως αδρανοποιημένο ιό το αντίστοιχο εμβολιακό στέλεχος υψηλής συγκέντρωσης. Κατόπιν συμμόλυνσης με ενεργό Sabin1 ιό και αδρανοποιημένο Sabin1 ιό, σε κύτταρα Rd ακολούθησε απομόνωση του γονιδιώματος ανωτέρω στελεχών σε συγκεκριμένες ώρες. Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές που επιτρέπουν την ανίχνευση των ενεργών εντεροϊών στοχεύοντας στον αρνητικό τους κλώνο. Ακολούθησε η εφαρμογή των τεχνικών της εκχυλίσεως του RNA, της αντίστροφης μεταγραφής, της PCR και της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR, με σκοπό

τον εντοπισμό χαμηλής συγκέντρωσης ενεργού ιού παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης αδρανοποιημένου ιού.

ABSTRACT

Enteroviruses belong to *Picornaviridae* family to *Enterovirus* genus. Their genome is a positive sense, single strand RNA molecule (+ssRNA), of 7.500 nucleotides in length, surrounded by a viral icosahedral protein capsid. Their genome are consisted of a highly conserved 5' untranslated region, an open reading frame and a 3' untranslated region ending in a poly(A)-tract. Most infections with enteroviruses are asymptomatic, but in some instances Enteroviruses can cause different clinical symptoms ranging from aseptic meningitis to paralytic poliomyelitis.

The main causal agent for the diagnosis of an enteroviral infection is the occurrence of clinical symptoms. Hence, as previously described, most infections remain asymptomatic and enteroviruses can circulate silently, increasing the risk of an outbreak. However, the detection of an enterovirus genome by PCR does not necessarily indicates that this enterovirus is actively replicating, so it is necessary to develop an assay that can distinguish between actively replicating enteroviruses from inactivated enteroviruses.

In the present study, a Stem Loop Mediated Reverse Transcription PCR assay for the detection of actively replicating Enteroviruses was designed targeting the negative strand, able to detect actively replicating Enteroviruses of low concentration in the presence of a high concentration of inactivated Enteroviruses, using the vaccinal strain Sabin1. For this purpose the enteroviral genome was extracted, reverse transcribed, thermocycled by PCR and finally electrophoresis of PCR products was applied in order to detect a low concentration of actively replicating Sabin 1 virus in the presence of a high concentration of inactivated Sabin 1 virus.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. Picornaviridae.....	9
1.1 Βιολογία των εντεροϊών.....	9
1.2 Ταξινόμηση των εντεροϊών.....	9
2. Δομή και οργάνωση γονιδιώματος των εντεροϊών	11
2.1 Δομή καψιδίου	11
2.2 Δομή γονιδιώματος.....	13
2.3 Μη κωδική περιοχή 5' - UTR	14
2.4 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)	16
2.5 Μη κωδική περιοχή 3' - UTR	18
2.6 Η VPg πρωτεΐνη.....	18
3. Υποδοχείς εντεροϊών.....	19
4. Κύκλος ζωής εντεροϊών.....	20
4.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο.....	22
4.2 Μετάφραση του ιικού RNA και πρωτεόλυση ιικής πολυπρωτεΐνης.....	23
4.3 Αντιγραφή του ιικού RNA	25
4.4 Συναρμολόγηση, ωρίμανση και απελευθέρωση των νέων ιικών σωματίων.....	27
5. Παθογένεια	29
5.1 Μετάδοση	29
5.2 Συμπτώματα.....	30
6. Πρόληψη.....	31
6.1 Παθητική Ανοσοποίηση.....	31
6.2 Εμβόλιο.....	31
7. Επιδημιολογία.....	32

8. Εξέλιξη Εντεροϊών.....	33
8.1 Μεταλλάξεις.....	33
8.2 Ανασυνδυασμός.....	34
Β. ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	36
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
1 Στελέχη Εντεροϊών	37
2 Ενοφθαλμισμός δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες	37
3 Μέτρηση ιικού τίτλου και σειριακές αραιώσεις.....	37
4 Αδρανοποίηση , μόλυνση και απομονώσεις.....	39
5 Εκχύλιση RNA	40
6 Εκκινητικά μόρια	41
7 Αντίστροφη Μεταγραφή	42
8 PCR.....	44
9 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.....	45
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Picornaviridae

1.1 Βιολογία των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae* και στο γένος *Enterovirus*. Είναι ιοί που δε φέρουν έλυτρο και το γονιδίωμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+) ssRNA, μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Η οικογένεια των ιών Picorna, εκτός από τους εντεροϊούς, περιλαμβάνει και άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως είναι οι πολιοϊοί, ο ιός της ηπατίτιδας Α, οι ρινοϊοί και ο FMDV (foot and mouth disease virus). Το όνομα αυτής της οικογένειας ιών, υποδηλώνει το μικρό τους μέγεθος (pico) και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος το οποίο απαρτίζει το ιικό τους γονιδίωμα (RNA) [1].

1.2 Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια *Picornaviridae* αποτελείται από 94 είδη που ομαδοποιούνται σε 40 γένη, σύμφωνα με τη νέα εγκεκριμένη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (10th International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV , July 2017), μέχρι και τον Φεβρουάριο του 2018 [2].

Aalivirus	Ampivirus	Aphthovirus	Aquamavirus	Avihepatovirus
Avisivirus	Bopivirus	Cardiovirus	Cosavirus	Crohivirus
Dicipivirus	Enterovirus	Erbovirus	Gallivirus	Harkavirus
Hepatovirus	Hunnivirus	Kobuvirus	Kunsagivirus	Limnipivirus
Megrivirus	Mischivirus	Mosavirus	Orivirus	Oscivirus
Parechovirus	Pasivirus	Passerivirus	Potamipivirus	Rabovirus
Rosavirus	Sakobuvirus	Salivirus	Sapelovirus	Senecavirus
Shanbavirus	Sicinivirus	Teschovirus	Torchivirus	Tremovirus

Πίνακας 1.2.1: Ταξινόμηση Picornaviridae [7].

Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται με βάση τις ομοιότητες που εμφανίζουν όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοσωματίου, τη γενωμική αλληλουχία και την οργάνωση του γονιδιώματος[1].

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί αποτελούνται από περισσότερους από 300 αντιγονικά διακριτούς ορότυπους, οι οποίοι με βάση τις ασθένειες που προκαλούν στους ανθρώπους αλλά και την παθογένειά τους στα πειραματόζωα κατηγοριοποιούνται σε 13 είδη. Από αυτά τα 3 είδη Rhinoviruses (A, B, C) και 4 από τους Enteroviruses παρουσιάζουν παθογένεια στον άνθρωπο. Αυτοί είναι :

Γένος εντεροϊών	Ορότυποι
<i>Enterovirus A</i>	25
<i>Enterovirus B</i>	63
<i>Enterovirus C</i>	23
<i>Enterovirus D</i>	5
<i>Enterovirus E</i>	5
<i>Enterovirus F</i>	7
<i>Enterovirus G</i>	2
<i>Enterovirus H</i>	1
<i>Enterovirus I</i>	1
<i>Enterovirus J</i>	6
<i>Rhinovirus A</i>	80
<i>Rhinovirus B</i>	32
<i>Rhinovirus C</i>	55

Πίνακας 1.2.2 : Ταξινόμηση Εντεροϊών και οι ορότυποί τους [7].

οι Πολιοϊοί , οι Coxsackie A , οι Coxsackie B και οι Echo ιοί [1]. Υπάρχουν και άλλοι εντεροϊοί που δεν έχουν ταξινομηθεί σε αυτές τις κατηγορίες, αλλά έχουν αριθμηθεί με βάση τη σειρά αναγνώρισής τους. Η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς τροποποιείται λόγω της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων.

Η κωδικοποιημένη από τους εντεροϊούς RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση δεν διαθέτει ικανότητα σωστής αντιγραφής (proof – reading) επιτρέποντας έτσι τον υψηλό ρυθμό μετάλλαξης κατά τη διάρκεια της αντιγραφής των εντεροϊών [3]. Επιπλέον, τα γονιδιώματα των Picornaviruses υπόκεινται σε συχνά γεγονότα ανασυνδυασμού [4-5].

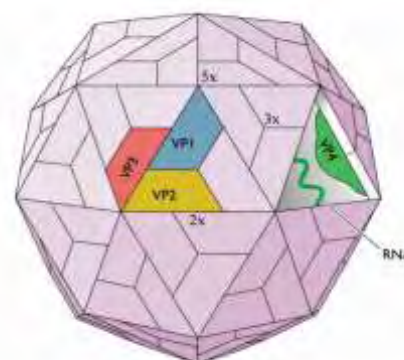
Οι περισσότερες λοιμώξεις από εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές , ωστόσο μερικές φορές μπορούν να προκαλέσουν ήπια έως σοβαρή νόσο όπως άσηπτη μηνιγγίτιδα , μυοκαρδίτιδα , εγκεφαλίτιδα και πολιομυελίτιδα [6].

2. Δομή και οργάνωση του γονιδιώματος των εντεροϊών

2.1 Δομή καψιδίου

Τα ιικά σωματίδια των εντεροϊών είναι σφαιρικά και έχουν διάμετρο περίπου 30 nm. Τα σωματίδια αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα που προστατεύει το γονιδίωμα του ιού και δεν περιλαμβάνουν λιπιδικό έλυτρο. Το καψίδιο των εντεροϊών παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον (pH <3) επιτυγχάνοντας έτσι την πρόσβαση στο έντερο, όπου και πολλαπλασιάζονται, μέσω του στομάχου.

Το ιικό καψίδιο είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας και αποτελείται από 60 αντίγραφα των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες είναι προϊόντα της πρωτεόλυσης της ιικής πολυπρωτεΐνης [8]. Κατά την πρωτεόλυση η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3, και VP1, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν το πρωτομερές (VP0, VP3 και VP1). Στη συνέχεια αυτά συσσωματώνονται, ώστε να σχηματιστεί ένα πενταμερές [(VP0, VP1, VP3)₅]. Κατόπιν 12 πενταμερή επιστρατεύονται για τον σχηματισμό του προκαψιδίου [(VP0, VP1, VP3)₅]₁₂. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης, όταν δηλαδή το RNA “πακετάρεται” στα ιικά σωματίδια και πραγματοποιείται το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του γενετικού υλικού, η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 διασπάται στις VP2 και VP4. Η VP4 είναι η μικρότερη καψιδιακή πρωτεΐνη, εντοπίζεται στο εσωτερικό του καψιδίου και δεν εκτίθεται στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου. Πέντε VP4 μονομερή σχηματίζουν στο εσωτερικό του σωματιδίου ένα υδρόφοβο περιβάλλον, που καθοδηγεί τη συναρμολόγηση

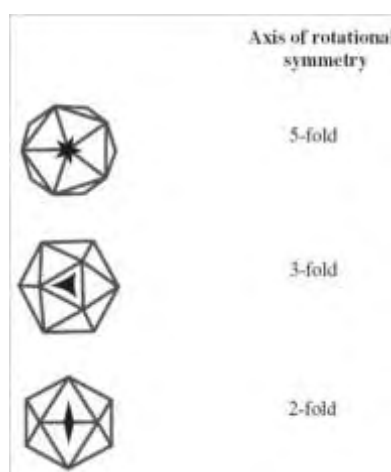


Εικόνα 2.1.1: Δομή καψιδίου ενός Picorna ιού.

Πηγή: www.Picornaviridae.com

ενός πενταμερούς. Την εξωτερική πλευρά του καψιδίου απαρτίζουν οι VP1 , VP2 και VP3 [9].

Χαρακτηριστικό του καψιδίου είναι η ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5x) άξονας συμμετρίας , ενώ μεταξύ των πενταμερών , βρίσκονται ο τριμερής (3x) και ο διμερής (2x) άξονας συμμετρίας. Πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας , ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας.

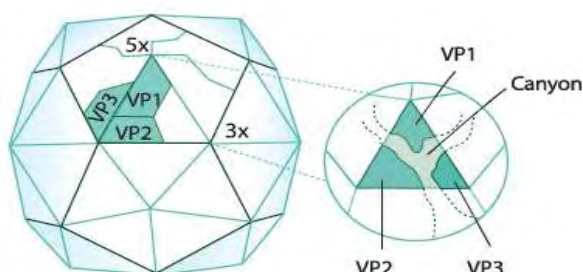


Εικόνα 2.1.2: Πενταμερής άξονα συμμετρίας , τριμερής άξονας , διμερής άξονας συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο[10].

Τα αμινοτελικά άκρα των VP1 , VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο με την VP4 , η οποία είναι συνδεδεμένη με το μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο. Η ποικιλία στους ορότυπους των ιών καθορίζεται από τις θηλιές των καψιδιακών πρωτεϊνών , οι οποίες προεξέχουν στην επιφάνεια του καψιδίου. Τα καρβοξυτελικά άκρα των VP1 , VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N – Ags) του ιού. Χαρακτηριστικό αυτών των περιοχών είναι ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων , παρέχοντας έτσι αντιγονική ποικιλία στους εντεροϊούς[11].

Μια βαθιά επιφανειακή κοιλότητα που είναι γνωστή ως αύλακα (canyon) περιβάλλει μια προεξοχή (plateau) σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα. Η αύλακα φέρει στο εσωτερικό της , κατάλληλες περιοχές

που μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς του κυττάρου – ξενιστή και έτσι μπορεί ο ιός να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου[12]. Η αύλακα είναι μικρή σε μέγεθος και δεν επιτρέπει την αναγνώριση των εσωτερικών περιοχών της από ογκώδη αντισώματα , προσφέροντας στον ιό μια στρατηγική για την αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης από τον ξενιστή[9]. Οι περιοχές στο εσωτερικό της αύλακας λόγω της μεγάλης εξειδίκευσής της αλληλεπίδρασής τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς , διατηρούνται φυλογενετικά μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Αντίθετα , περιοχές του ιικού καψιδίου με μικρή λειτουργική σημασία για τον ιό , παραμένουν στερεοδομικά απροστάτευτες στην περιφέρεια της αύλακας και λειτουργούν ως επίτοποι. Οι επίτοποι αν και βρίσκονται σε προσιτά σημεία στα αντισώματα, η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να αποφευχθεί χάρη στη μεταβλητότητα των περιοχών αυτών , με αποτέλεσμα την εξέλιξη νέων οροτύπων.



Εικόνα 2.1.3: Αύλακα canyon[13].

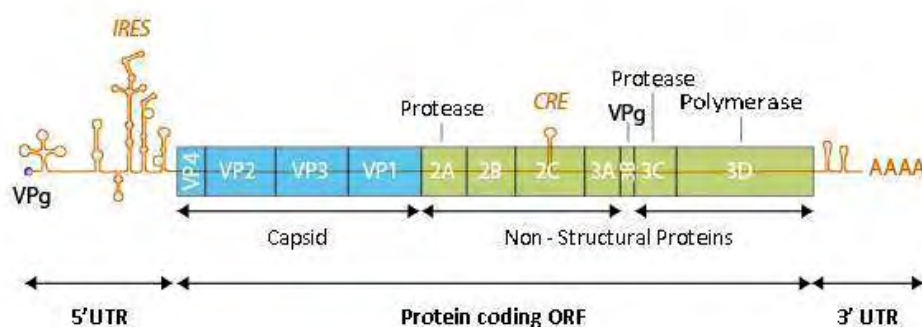
2.2 Δομή γονιδιώματος

Το γένωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας , το μήκος του οποίου είναι περίπου 7500 νουκλεοτίδια [14]. Αυτό αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές :

- Την 5' μη κωδική περιοχή (5' untranslated region , 5' – UTR)
- Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame – ORF)
- Την 3' μη κωδική περιοχή (3' untraslated region , 3' – UTR)

Το τμήμα του γενετικού υλικού προς το 5' άκρο χαρακτηρίζεται από την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' – UTR). Ακολουθεί το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που περιέχει τις πληροφορίες για τις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες

του ιού και τέλος στο 3' άκρο υπάρχει μια 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' – UTR) που ακολουθείται από μια πολυαδενυλιωμένη περιοχή (poly(A)tract). Το γενωμικό RNA των πολιοϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome linked) [15,16]. Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [17,18].



Εικόνα 2.2.1: Οργάνωση του γονιδιώματος των Εντεροϊών [13].

2.3 5' μη κωδική περιοχή (5' – UTR)

Αποτελεί το 8-12 % του γενετικού υλικού των Picorna ιών. Παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων , καθώς περιέχει μεγάλα τμήματα νουκλεοτιδίων που διατηρούνται πλήρως ή μερικώς από είδος σε είδος [19]. Αυτό υποδηλώνει ότι η 5' – UTR επηρεάζει την παθογένεια του ιού , η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων αυτής της περιοχής. Οι συντηρημένες αυτές αλληλουχίες της 5' – UTR εμπλέκονται στον εγκλεισμό του RNA στο ιικό καψίδιο και στον πολλαπλασιασμό του ιού. Η 5' – UTR των εντεροϊών έχει διαφορετική σύσταση νουκλεοτιδίων από το υπόλοιπο γένωμα. Περιέχει χαμηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων με αζωτούχες βάσεις , την αδερίνη και την θυμίνη (A+T) και σημαντικά υψηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων με αζωτούχες βάσεις την

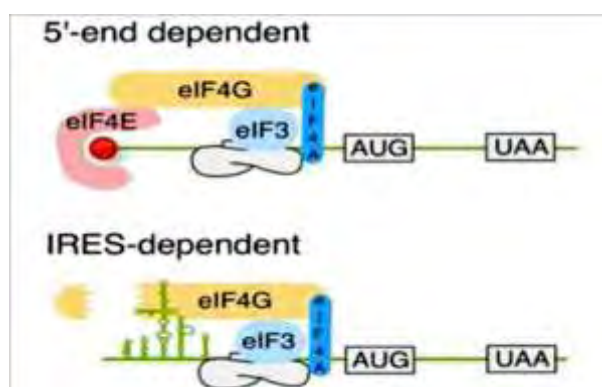
γουανίνη και την κυτοσίνη (G+C) [19] , γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής [20].

Η 5' – UTR έχει μέγεθος περίπου 750 νουκλεοτίδια και αποτελείται από επτά δομικά στοιχεία (domain I – VII) και διαιρείται σε τρία επιμέρους τμήματα (φουρκέτες) :

- Την περιοχή cloverleaf (domain I) , η οποία αποτελείται από τα πρώτα 88 νουκλεοτίδια
- Την περιοχή IRES (Internal Ribosomal Entry Site – Εσωτερική θέση πρόσδεσης του Ριβοσώματος) (domain II – VI) , η οποία αποτελείται από τα νουκλεοτίδια 127 έως 608 και
- Την περιοχή (domain VII) , που περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης.

Το cloverleaf αποτελεί μια δομή με σχήμα τριφυλλιού και cis – δραστικότητα , η οποία είναι σημαντική τόσο για την σταθερότητα του RNA όσο και για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας [21].

Το IRES είναι ένα στοιχείο με cis – δραστικότητα και είναι υπεύθυνο για τη μετάφραση και τη μολυσματικότητα του ιού [22]. Τα ριβοσώματα και οι κυτταρικοί παράγοντες της μετάφρασης προσδένονται στο εσωτερικό του IRES και στη συνέχεια μετακινούνται μέχρι το κωδικόνιο έναρξης ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης.



Εικόνα 2.3 : Cloverleaf (domain I) και IRES (domain II – VII) [23].

2.4 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

Μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη περίπου 2100 κωδικονίων , η οποία χωρίζεται σε 3 περιοχές :

- A) P1 , δομικές πρωτεΐνες
- B) P2 και P3 , λειτουργικές πρωτεΐνες

Για τον διαχωρισμό της σε αυτές τις τρεις περιοχές, η πολυπρωτεΐνη διασπάται αυτοκαταλυτικά από δύο ικές πρωτεάσες:

- Την 2A [24] , που επιτελεί τον αρχικό διαχωρισμό μεταξύ δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών και
- Την 3C , που εκτελεί την υπόλοιπη επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης [25].

Η πολυπρωτεΐνη περιέχει πληροφορίες για τις τέσσερις δομικές (VP1 – VP4) και για τις επτά λειτουργικές (2A – 2C και 3A – 3D) πρωτεΐνες όπως οι VP0 , 2BC , 3AB , και 3CD [1].

A) Ανοιχτό πλαίσιο ORF – (δομικές πρωτεΐνες)

Κωδικοποιεί για τις ικές πρωτεΐνες VP1 , VP2 , VP3 και VP4 , οι οποίες αποτελούν τα δομικά στοιχεία του ιικού καψιδίου. Επίσης η VP1 παρέχει αξιόπιστη συσχέτιση της αλληλουχίας με τον ορότυπο . Μοριακές μελέτες υποδεικνύουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής ως κατάλληλο μέσο για την ταυτοποίηση των διάφορων οροτύπων εντεροϊών [26].

B) Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF – (λειτουργικές πρωτεΐνες)

Οι μη δομικές περιοχές P2 και P3 κωδικοποιούν για τις λειτουργικές πρωτεΐνες , οι οποίες επτά είναι οι : 2A , 2B , 2C , 3A , 3B , 3C και 3D , ενώ σε μερικές περιπτώσεις απαιτούνται και οι πρόδρομες πρωτεΐνες, τα λειτουργικά ενδιάμεσα των πρωτεϊνών αυτών (2BC , 3AB , 3CD) [9].

Η 2A πρωτεάση πραγματοποιεί το πρωταρχικό ρήγμα στην πολυπρωτεΐνη , διαχωρίζοντας τις περιοχές P1 – P2 και κατά συνέπεια τις πρόδρομες δομικές πρωτεΐνες από τις λειτουργικές [24]. Εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιικού RNA , διεγείροντας την έναρξη σύνθεσης της αρνητικής

του αλυσίδας [27] και ευθύνεται για την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου ξενιστή [28].

Η 2B πρωτεΐνη εμπλέκεται σε αρχικό στάδιο της σύνθεσης του ιικού RNA [29] και έχει την ικανότητα να αυξήσει την διαπερατότητα των μεμβρανών [30].

Η 2C πρωτεΐνη είναι μια ελικάση που συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής και στη σταθεροποίηση του στις μεμβράνες του κυττάρου – ξενιστή [31,32]. Συμβάλλει ακόμη, στον πολλαπλασιασμό του ιού [33] και στον προσδιορισμό της δομής του καψιδίου του [34].

Η 2BC πρωτεΐνη είναι το πρόδρομο μόριο των 2B και 2C πρωτεϊνών και προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και τη δημιουργία κυστιδίων , όπου λαμβάνει χώρα η ιική αντιγραφή [35].

Η 3A πρωτεΐνη επάγει αλλαγές στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και στο σχηματισμό των κυστιδίων για την ιική αντιγραφή [36] , εμπλέκεται στη σύνθεση της αλυσίδας του ιικού RNA και στη σωστή επεξεργασία της ικής πολυπρωτεΐνης [37] , και επιδρά στο εκκριτικό σύστημα του κυττάρου – ξενιστή εμποδίζοντας τη μεταφορά των πρωτεϊνών του από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi , σε συνεργασία με τις 2B και 2BC [38].

Η 3AB πρωτεΐνη συμβάλλει στην έναρξη της σύνθεσης του RNA με τη σταθεροποίηση της VPg στις μεμβράνες, διεγείρει τη δράση της ικής πολυμεράσης [39] και την πρωτεολυτική ενεργότητα της 3CD πρωτεάσης [40].

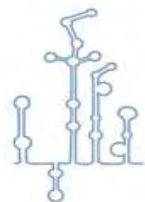
Η 3C πρωτεΐνη πραγματοποιεί την πληθώρα των πρωτεολυτικών διασπάσεων της ικής πολυπρωτεΐνης [25] , διεγείρει την ική μετάφραση αλλά μπορεί και να την μπλοκάρει με την πρόσδεσή της στο IRES και να αναστείλει την κυτταρική μεταγραφή και μετάφραση [41]

Η 3D πολυμεράση είναι μια RNA εξαρτώμενη πολυμεράση και είναι το κύριο ένζυμο για την αντιγραφή του ιού , χρησιμοποιώντας την VPg πρωτεΐνη ως εκκινητικό μόριο. Επίσης έχει δραστικότητα ελικάσης [42].

Η 3CD πρωτεΐνη έχει δράση πρωτεάσης [25]. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ιική αντιγραφή [36] και έχει την ικανότητα να αυτοκαταλύεται στον πύρηνα του κυττάρου σε 3C και 3D , με την 3C να πρωτολύει μεταγραφικούς παράγοντες , εμποδίζοντας τελικά τη μεταγραφή στο κύτταρο [43].

2.5 3' μη κωδική περιοχή (3' – UTR)

Εντοπίζεται μετά το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και σε αυτή την περιοχή περιλαμβάνεται μια χαρακτηριστική RNA δευτεροταγή δομή θηλιάς. Στο 3' άκρο της , φέρει μια poly - (A) - ουρά [44]. Το τμήμα αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού και στην μολυσματικότητα του [45]. Η 3' – UTR αποτελεί βασικό κομμάτι στη ρύθμιση της ικής μετάφρασης , αλληλεπιδρώντας με το στοιχείο IRES [46].



Εικόνα 2.5.1: Περιοχή IRES [13]

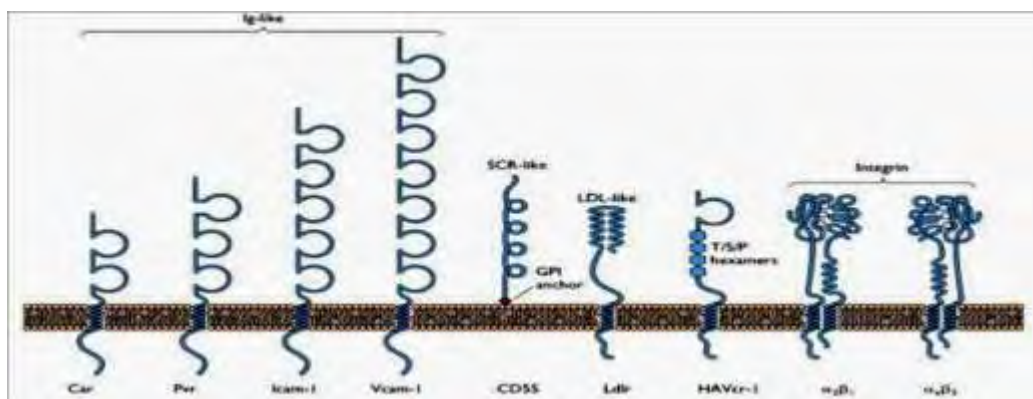
2.6 Η VPg πρωτεΐνη

Το γένωμα των Picorna ιών είναι μοναδικό , γιατί στο άκρο της 5' μη κωδικής περιοχής αντί της συνηθισμένης μεθυλιωμένης καλύπτρας είναι προσδεμένη μια μικρή ιική πρωτεΐνη , η VPg , η οποία πιστεύεται ότι συμβάλλει στον εγκλεισμό του γονιδιώματος στο καψίδιο [17]. Η VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη , με δεσμό O_4 - (5' - ουριδύλιο) - τυροσίνης , με το 5' - ουριδυλιωμένο τμήμα του ιικού RNA. Η τυροσίνη που είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA είναι πάντα το τρίτο αμινοξύ πριν το N – άκρο . Η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται με τον σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της

μονοφωσφορικής ομάδας στο 5' – άκρο του ιικού γονιδιώματος με το τελικό νουκλεοτίδιο ουρακίλης του RNA και με ένα κατάλοιπο τυροσίνης της ιικής πρωτεΐνης VPg [47].

3. Υποδοχείς Εντεροϊών

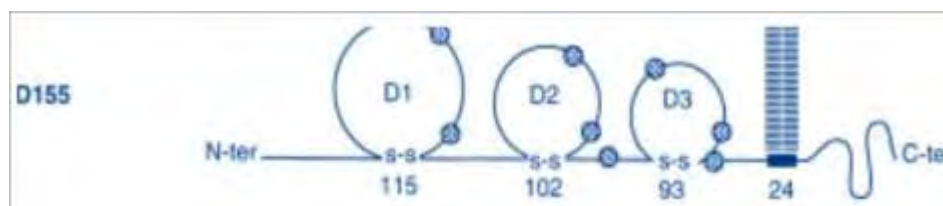
Οι εντεροϊοί εισβάλλουν στο κύτταρο ξενιστή μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας υποδοχέων και μηχανισμών εισόδου, σημαίνοντας έτσι την έναρξη του παθογόνου τους κύκλου. Οι υποδοχείς εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου – ξενιστή, ενώ συμμετέχουν και στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Τα μόρια στόχοι – υποδοχείς στις επιφάνειες των κυττάρων – ξενιστών είναι κατά κανόνα γλυκοπρωτεΐνες ή και γλυκολιπίδια. Η πλειονότητα των υποδοχέων των εντεροϊών συνδέεται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3 στην αύλακα που σχηματίζεται [48].



Εικόνα 3.1 : Οι υποδοχείς των Picorna ιών [23].

Η δομή των υποδοχέων είναι παρόμοια και περιέχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών. Τέτοιοι υποδοχείς είναι οι ICAM – I (intracellular adhesion molecule – 1), ο οποίος έχει βρεθεί ότι συνδέεται με τον Coxsackie A21, ο οποίος συμμετέχει στην είσοδο των Coxsackie B ιών στο

κύτταρο – ξενιστή [49] και στην έναρξη του κύκλου ζωής του ιού [50] και ο PVR , ο οποίος συνδέεται με τους πολιοιούς.



Εικόνα 3.2 : Δομή του υποδοχέα PVR [51].

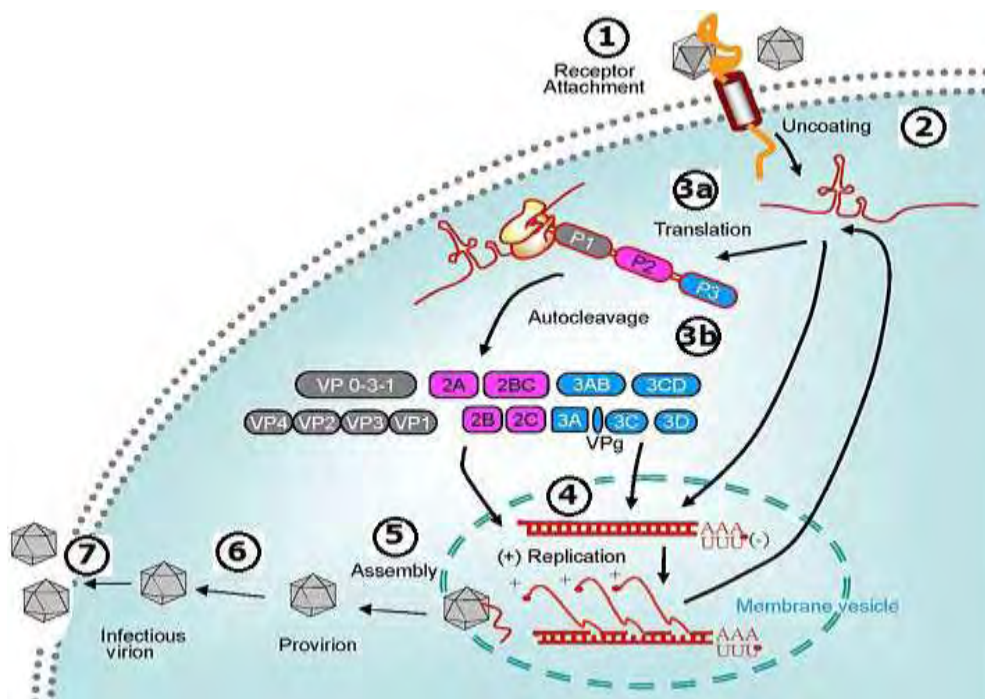
Με τη σύνδεσή τους στο καψίδιο του ιού προκαλούν αναδιάταξη του καψιδίου και απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κύτταρο ξενιστή [48]. Υπάρχουν βέβαια και ιοί που δεν συνδέονται στην αύλακα , αλλά εξωτερικά αυτής και δεν αποσταθεροποιούν το ιικό καψίδιο. Ένας τέτοιος υποδοχέας είναι ο DAF (Decay Acceleration Factor ή CD55) , στον οποίο προσδένονται ορισμένοι Echo και Coxsackie B ιοί [52]. Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με τον υποδοχέα δεν είναι πάντα επαρκής για την είσοδο του στο κύτταρο και απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ή υποδοχέα (συνυποδοχέα).

4. Κύκλος ζωής εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους στο κυτταρόπλασμα. Πρώτα , πραγματοποιείται η σύνδεση με τον κυτταρικό υποδοχέα και στη συνέχεια επιτελείται η είσοδος στο κύτταρο – ξενιστή μέσω ενδοκύττωσης. Ακολουθεί η διαδικασία της απέκδυσης , κατά την οποία το ιικό RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα μετά από δομικές αλλαγές στο καψίδιο του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών λειτουργεί απευθείας ως m-RNA , το οποίο μεταφράζεται αμέσως μετά τη μόλυνση του κυττάρου – ξενιστή. Αποτέλεσμα της μετάφρασης αυτής είναι μια πολυπρωτεΐνη , η οποία τεμαχίζεται και προκύπτουν τόσο δομικές όσο και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού , οι οποίες έχουν περιγραφεί παραπάνω. Μια από τις λειτουργικές πρωτεΐνες είναι η ιική RNA – εξαρτώμενη RNA πολυμεράση , η οποία καταλύει την αντιγραφή. Η αντιγραφή του ιού γίνεται σε σύμπλοκα , τα οποία

αποτελούνται από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Για να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει πρώτα το γονιδίωμα του να μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας, το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας. Ένα μέρος των (+) RNA κλώνων θα χρησιμοποιηθεί ως m-RNA και το άλλο θα αποτελέσει το γένωμα των ώριμων πλέον ιικών σωματιδίων. Αφού γίνει η σύνθεση του καψιδίου από τις δομικές πρωτεΐνες, ακολουθεί η καψιδίωση του ιού και η έξοδος του από το κύτταρο – ξενιστή μέσω λύσης του κυττάρου [1].

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού, ποικίλλει από 5 ώρες έως 10 ώρες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστή και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης [53].



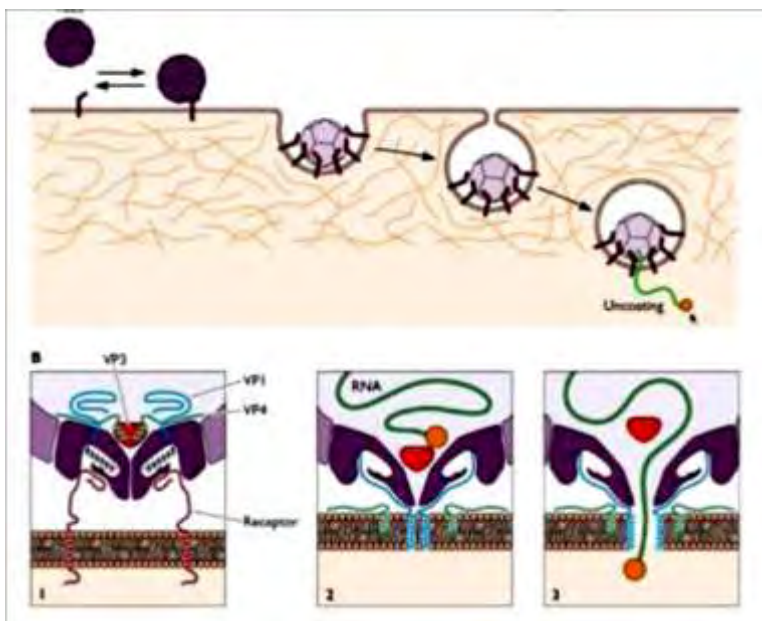
Εικόνα 4 : Κύκλος ζωής των εντεροϊών [1].

4.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο

Η μόλυνση των κυττάρων από τους εντεροϊούς ξεκινά με τη σύνδεση τους σε έναν υποδοχέα της μεμβράνης του κυττάρου – ξενιστή. Μια μεγάλη ποικιλία από μόρια χρησιμοποιούνται ως υποδοχείς των εντεροϊών , όπως πρωτεΐνες , υδατάνθρακες και γλυκολιπίδια [54]. Στους περισσότερους εντεροϊούς , οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3 , στη σχηματιζόμενη αύλακα (canyon) και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου [55].

Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει την παθογόνο δράση ενός ιού , καθώς και την ασθένεια που προκαλεί. Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών , με τρεις εξωκυτταρικές Ig – like περιοχές [56,57]. Η αλληλεπίδραση του εντεροϊού με τον υποδοχέα του , οδηγεί σε σημαντικές δομικές αλλαγές στον ιό. Τα σωματίδια που προκύπτουν (Α σωματίδια) , περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική καψιδιακή πρωτεΐνη VP4. Ωστόσο , η N – τελική περιοχή της VP1 , η οποία κανονικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου , βρίσκεται στην επιφάνεια των Α σωματιδίων [58].

Η αλληλουχία αυτής της VP1 είναι υδροφοβική και τα Α σωματίδια έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N – άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη , σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Το RNA δεν είναι γνωστό αν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωματίων (ενδοκύτωση). Η ενδοκύτωση από μόνη της δε μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του ιού , καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση είναι αυτές που οδηγούν στην απέκδυσή του [54].



Εικόνα 4.1: Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο [23]

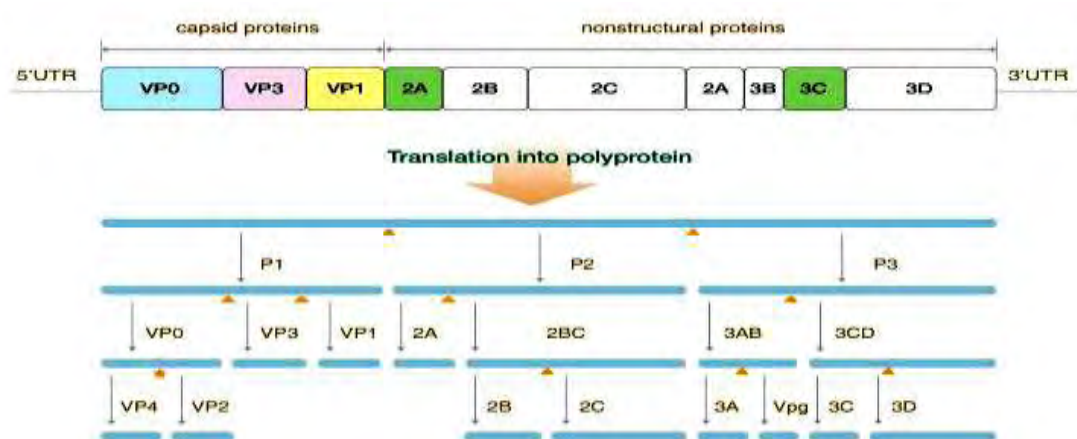
1. Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα 2. Αποσταθεροποίηση του καψιδίου και απομάκρυνση της σφιγγοσίνης (με μαύρο) που εντοπίζεται στη βάση της αύλακας, μέσα σε υδρόφοβα " πακέτα" 3. Οι υδρόφοβες VP1 και VP4 δημιουργούν πόρους στη μεμβράνη και έτσι απελευθερώνεται το RNA θετικής πολικότητας στο κυτταρόπλασμα [23].

4.2 Μετάφραση του ιικού RNA και πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης

Κατά την είσοδο του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση και δεν έχει εισέλθει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο του καψιδίου. Το θετικής πολικότητας RNA δε φέρει δομές 5' – καλύπτρας , είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη , η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [59]. Νουκλεοτιδική αλληλούχιση του θετικού κλώνου του πολιοϊού , ο οποίος αποτελεί και το καλύτερα μελετημένο μοντέλο των εντεροϊών , αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' – άκρο , που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [60,57]. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5' – αμετάφραστες περιοχές, αλλά δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα

ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος IRES (Internal Ribosome Entry Site).

Οι πρωτεΐνες των πολιοϊών συντίθενται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολύπρωτεϊνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Με βάση αυτό επιτρέπεται η σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολύπρωτεϊνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (in cis) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες in cis ή in trans (διαμοριακές). Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για δυο πρωτεϊνάσες : την 2Apro και την 3Cpro ή 3CDpro [53].



Εικόνα 4.2: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεϊνης [23].

Τόσο η 3Cpro όσο και η 2Apro είναι ενεργές στο πολυπεπτίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από αυτό με αυτό – τεμαχισμό. Μόλις ελευθερωθούν οι πρωτεϊνάσες , τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη in trans. Σε κύτταρα μολυσμένα με εντεροϊούς , το αρχικό γεγονός αποτελεί η απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2 – P3 μέσω της 2Apro. Στη συνέχεια η 3CDpro απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Αυτή η πρωτεΐνάση , που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, πραγματοποιεί δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια γλουταμινικού – γλυκίνης στον πολιοϊό τύπου 1 πιο

αποτελεσματικά σε σχέση με την 3Cpro. Τόσο 3Cpro όσο και η 3CDpro, οι μη δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3Cpro, 3Dpol και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1, και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η 3Dpol αλληλουχία μέσα στην 3CDpro απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστική επεξεργασία από το 3Cpro μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2, έτσι η έκφραση μπορεί να ελεγχθεί από το ρυθμό και την έκταση της πρωτεολυτικής διαδικασίας. Εναλλακτική χρήση των θέσεων πρωτεόλυσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πρωτεϊνών με διαφορετικές δραστηριότητες [53].

4.3 Αντιγραφή του ιικού RNA

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει κατά την είσοδο του στο κύτταρο ξενιστή και πραγματοποιείται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA όπως τα σύμπλοκα 3Dpol, 2C^{ATPase}, 3A, 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC και 3AB καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2. Μέρος του συμπλόκου αυτού αποτελεί και το ιικό RNA, που περιέχει cis – acting στοιχεία, όπως η δομή “cloverleaf” που βρίσκεται στην 5’ – UTR και η δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο [61-64]. Οι ιικές πρωτεΐνες 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την 3Dpol και την 3CDpro, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ιικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [65].

Για να μπορέσει να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει αρχικά το γονιδίωμα του να μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο θα αποτελέσει

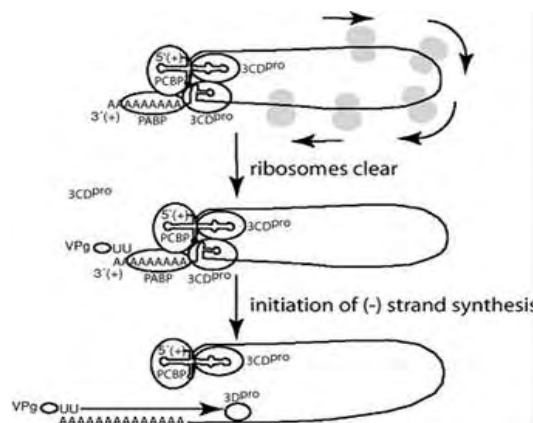
μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας [66]. Ένα μοντέλο αντιγραφής του RNA θα μπορούσε να είναι το εξής: ιικό RNA(+) → σύνθεση RNA(-) → RF → σύνθεση RNA(+) → RI → RNA(+), όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη καθώς, η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών [0].

Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση του ιού (3Dpol) παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης 3CDpro, η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεΐνάση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης. Η 3Dpol είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται από εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η 3Dpol δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους πολιοϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο τον νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδυλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδυλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των εντεροϊών [68-70].

Επομένως, συνειδητοποιούμε πως το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA, αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός, όπου η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει τότε το RNA αντιγράφεται και τότε μεταφράζεται [01]. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (PCBP) στην δομή αυτή, επάγει τη μετάφραση. Όταν η 3CDpro συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει τη μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα.

4.4 Συναρμολόγηση , ωρίμανση και απελευθέρωση των νέων ιικών σωματίων.

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, η οποία είναι η πρόδρομη καψιδιακή πρωτεΐνη, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελίου και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 ελευθερωθεί από τη 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 πέπτονται από την πρωτεϊνάση 3CDpro. Οι θέσεις κοπής βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο των VP1, VP2 και VP3 βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Μέσω αυτής της επεξεργασίας παράγεται το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Στη συνέχεια, πέντε πρωτομερή συγκροτούνται για το σχηματισμό ενός πενταμερούς. Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει την πέψη των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2.



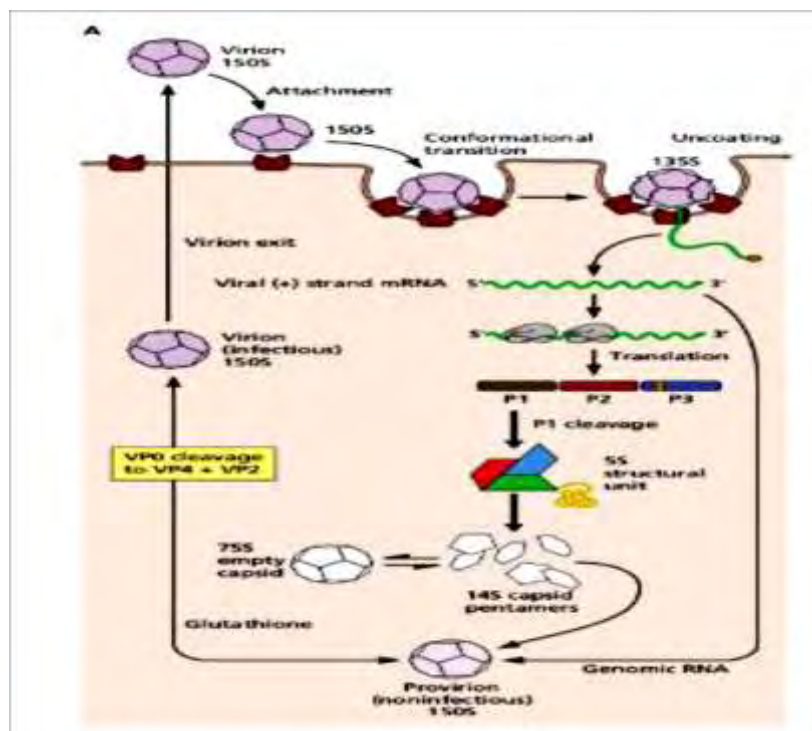
Εικόνα 4.3: Μοντέλο κυκλοποίησης του ιικού RNA, κατά την αντιγραφή των εντεροϊών [1].

Η πρωτεϊνάση η οποία πραγματοποιεί τον τελευταίο αυτό τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί. Ο δεσμός της VP0 που πέπτεται, βρίσκεται στο εσωτερικό

των καψιδίων και στα ώριμα ιικά σωματίδια και δεν είναι προσιτός από ικές και κυτταρικές πρωτεΐνες [17,67].

Η καψιδίωση των ιών *ricorna* είναι εξαιρετικά ειδική και οδηγεί στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι του ιικού mRNA, του αρνητικού κλώνου RNA ή οποιουδήποτε κυτταρικού RNA [17,67]. Η VPg δεν αποτελεί σήμα καψιδίωσης, καθώς ο αρνητικός κλώνος RNA που περιέχει την VPg δεν πακετάρεται. Η σύνδεση της καψιδίωσης με τη σύνθεση του ιικού RNA μπορεί να εξηγήσει την εκλεκτικότητα του πακεταρίσματος με τον ιικό θετικό κλώνο RNA.

Όσον αφορά την απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιικών σωματιδίων, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης [72].



Εικόνα 4.4: Συναρμολόγηση , ωρίμανση και απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων [23].

5. Παθογένεια

5.1 Μετάδοση

Οι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της εντεροστοματικής οδού. Εισέρχονται από τη στοματική κοιλότητα ή το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και μετέπειτα πολλαπλασιάζονται στον λεμφικό ιστό του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος. Ο ιός Coxsackie (CAV21) μεταδίδεται κυρίως από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος και ο εντεροϊός 70 (EV70) εκκρίνεται στα δάκρυα και μεταδίδεται μέσω των δακτύλων και των κοπράνων [1]. Λοιμώξεις από Coxsackie virus μπορούν να μεταδοθούν απευθείας από άτομο σε άτομο μέσω των κοπράνων , του στόματος ή την επαφή με εκκρίσεις του φάρυγγα [73].

Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό των εντεροϊών στον λεμφικό ιστό του φάρυγγα και στο λεπτό έντερο , προκαλείται ιαιμία , η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό του ιού σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο – στόχο (νωτιαίος μυελός , εγκέφαλος , μήνιγγες , μυοκάρδιο και δέρμα).

Ο χρόνος επώασης του ιού , δηλαδή ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας , είναι για τους εντεροϊούς 3 - 10 μέρες (συνήθως 3 – 6 μέρες) , αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2 – 35 ημέρες , σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό , σε άτομα που έχουν είτε κλινικές , είτε υποκλινικές ενδείξεις , ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για οκτώ εβδομάδες και εντοπίζεται στον φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες. Μπορεί να παραμείνει βιώσιμος για πολλά χρόνια σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες (μεταξύ -20°C και -70°C) , καθώς και για εβδομάδες στους 4°C , αλλά χάνει την μολυσματικότητά του καθώς η θερμοκρασία ανεβαίνει.

Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα από εγκεφαλονωτιαίο υγρό , από νωτιαίο μυελό , από τον εγκέφαλο , την καρδιά , τον επιπεφυκότα , από πληγές του δέρματος ή από τις βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών [14].

5.2 Συμπτώματα

Οι εντεροϊοί προκαλούν μια ευρεία ποικιλία οξέων συμπτωμάτων , ως αποτέλεσμα της προσβολής του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος , του μυοκαρδίου , των σκελετικών μυών , του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννώδων μεμβρανών [74].

Όταν οι εντεροϊοί προσβάλλουν το νευρικό σύστημα μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες όπως , παράλυση (πολιοϊός , πολιομυελίτιδα , Εντεροϊός – Cocksackie ή Echo) [75,76] , άσηπτη μηνιγγίτιδα , μηνιγγίτιδα. Περίπου το 70% όλων των περιπτώσεων μηνιγγίτιδας οφείλονται σε εντεροϊούς , και συγκεκριμένα στους τύπους Cocksackievirus A7 , A9 και B2 – 5 [77]. Άλλη ασθένεια που οφείλεται σε Εντεροϊό είναι η HFMD (Hand Foot Mouth Disease) [78] , η οποία είναι μια ήπια παιδική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από πληγές στο στόμα και βλάβες , αγγειακές κυρίως , στα χέρια και στα πόδια. Ασθένειες του αναπνευστικού έχουν επίσης συσχετιστεί με διάφορα στελέχη εντεροϊών , όπως το EV 68 [79]. Οι Cocksackie B ιοί σχετίζονται με την ανθρώπινη καρδιομυοπάθεια σε ποσοστό 30% των περιπτώσεων [80]. Cocksackie B και Echo ιοί έχουν συσχετιστεί με τον διαβήτη τύπου Ι [81,82].

Τα συνηθέστερα συμπτώματα σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας είναι :

- κεφαλαλγία
- πυρετός > 38°C
- εμετοί
- αυχενική δυσκαμψία
- μυαλγίες
- κακουχία
- ρίγος
- πονόλαιμος
- κοιλιακά άλγη
- ναυτία
- φωτοφοβία
- υπνηλία

Ασθενείς με μηνιγγίτιδα οφειλόμενη σε εντεροϊό συχνά παρουσιάζουν συμπτώματα παρόμοια με αυτά της γρίπης. Η πορεία της νόσου είναι μέσης βαρύτητας και καλοήθης. Γενικά η άσηπτη μηνιγγίτιδα θεωρείται αυτοπεριοριζόμενη νόσος με χαμηλή θνησιμότητα. Η πλήρης αποθεραπεία υπολογίζεται σε 5 – 14 μέρες, αν και οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν για μήνες μετά την αποθεραπεία κακουχία , ναυτία και αδυναμία.

6. Πρόληψη

6.1 Παθητική Ανοσοποίηση

Το 1950 ο Γουίλιαμ Χάμον στο Πανεπιστήμιο του Πίτσμπουργκ απομόνωσε κεκαθαρμένη γ – σφαιρίνη από το αίμα ασθενών με πολιομυελίτιδα που επιβίωσαν [83] , ο οποίος πρότεινε ότι η γ – σφαιρίνη που περιέχει αντισώματα έναντι του ιού , μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να σταματήσει τη λοίμωξη από τον ιό , να αποτρέψει ασθένειες και να μειώσει τη δριμύτητα σε ασθένειες που είχαν συσταλτική πολιομυελίτιδα. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά και έδειξαν ότι η γ – σφαιρίνη μείωνε κατά 80% την πιθανότητα εμφάνισης παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Ωστόσο αυτή η τεχνική κρίθηκε μη πρακτική για διαδεδομένη χρήση λόγω της χρήσης μεγάλων ποσοτήτων αίματος και έτσι η ιατρική κοινότητα έστρεψε το βλέμμα της στην ανάπτυξη του εμβολίου για την πολιομυελίτιδα [84].

6.2 Εμβόλιο

Η ανάπτυξη εμβολίων κατά της πολιομυελίτιδας κατέστη δυνατή καθώς υπάρχουν μόνο τρεις τύποι πολιο - ιών . Το 1954, ο Dr Jonas Salk και το 1960 Dr Albert Sabin και οι συνεργάτες τους ανέπτυξαν το νεκρό ενδομυϊκό εμβόλιο (IPV) και το από του στόματος εξασθενημένο εμβόλιο (OPV), αντίστοιχα. Και τα δύο εμβόλια οδηγούν στην παραγωγή αντισωμάτων κατά του ιού της πολιομυελίτιδας, με επακόλουθο την προστασία από τη νόσο [85]. Μετά την εισαγωγή των εμβολίων στο τέλος της δεκαετίας του '50 και αρχές του '60, το μεγαλύτερο μέρος του αναπτυγμένου κόσμου είναι τώρα ελεύθερο από την πολιομυελίτιδα. Σε πολλές

αναπτυσσόμενες χώρες, το επιχορηγούμενο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) πρόγραμμα εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας, έχει κάνει πολύ μεγάλη πρόοδο [74]. Μέχρι τώρα, κανένα εμβόλιο για τους μη πολιο - εντεροϊούς δεν έχει αναπτυχθεί με επιτυχία, λόγω του μεγάλου αριθμού διαφορετικών τύπων εντεροϊών. Το μόνο αποτελεσματικό μέτρο για τον έλεγχό τους είναι οι υψηλές συνθήκες ατομικής και ομαδικής υγιεινής. Η απομόνωση των ασθενών σε περιόδους εξάρσεων των λοιμώξεων δεν είναι αποτελεσματική, γιατί υπάρχουν σε μεγάλη συχνότητα υποκλινικές λοιμώξεις [86].

Μέχρι τώρα, κανένα φάρμακο έναντι των *picorna* ιών δεν έχει πάρει έγκριση για θεραπεία των λοιμώξεων από εντεροϊούς. Η ευαισθησία των κυττάρων, η προσκόλληση του ιού, η απελευθέρωση του ιού, ο αναδιπλασιασμός του RNA του ιού και η πρωτεϊνοσύνθεση του ιού, έχουν μελετηθεί ως πιθανοί στόχοι έναντι των ιών *picorna* [87].

7. Επιδημιολογία

Μελέτες της μοριακής παραλλαγής ιικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων προσφέρουν σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες για ιογενείς ασθένειες. Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των εντεροϊών και την ταξινόμησή τους και επίσης διευκρινίζουν την προέλευση των κρουσμάτων.

Για τους εντεροϊούς η κύρια επιδημιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την άμεση ανάλυση της γενετικής παραλλαγής είναι η αλληλούχιση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει ομοιότητες και μικρές διαφορές μεταξύ αρκετών στελεχών ιών. Η εισαγωγή της τεχνικής αυτής και η εφαρμογή της στη μελέτη των απομονώσεων άγριων εντεροϊών από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχει επεκτείνει σημαντικά την επιδημιολογική δύναμη μοριακών μελετών [88].

Η τεχνολογία της αλληλούχισης έχει εφαρμοστεί πιο διεξοδικά σε μελέτες PVs , όπου η πληροφορία έχει αποδειχθεί πολύτιμη , για την στήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης των πολιοϊών. [89,90]. Από τις μελέτες αυτές , είναι δυνατόν να προσδιοριστεί πρώτον εάν ένα απομονωμένο στέλεχος πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου , δεύτερον κάποιες ομοιότητες μεταξύ των στελεχών σε μια επιδημία και τρίτον διαφορές μεταξύ των προϊόντων απομόνωσης

από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Συγκρίνοντας τις αλλαγές που παρατηρούνται μεταξύ των διάφορων στελεχών του ιού , μπορεί να προσδιοριστεί η γεωγραφική και χρονική προέλευσή του [91-93].

Μελέτες σχετικά με τη μοριακή επιδημιολογία των μη – πολιο εντεροϊών , έχουν επικεντρωθεί στο εξελικτικό συμπέρασμα που προέρχεται από τη σύγκριση των απομονώσεων του ιού μέσα σε ένα ορότυπο , καθώς και τη σύγκριση των απομονώσεων από διαφορετικούς οροτύπους και ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών εντός της οικογένειας Picornaviridae.

Οι non – polio εντεροϊοί , όπως για παράδειγμα οι Cocksackie A και B ιοί , αποτελούν το κορυφαίο αναγνωρίσιμο αίτιο της άσηπτης μηνιγγίτιδας , η οποία είναι η πιο συχνή ασθένεια που σχετίζεται με λοιμώξεις εντεροϊών. Σε εύκρατα κλίματα , αυτές οι λοιμώξεις εμφανίζονται κατά τη διάρκεια των μηνών του καλοκαιριού και του φθινοπώρου. Τα μικρά παιδιά είναι τα πιο κοινά θύματα , επειδή ο αριθμός των μολύνσεων με εντεροϊούς είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ηλικία των ευπαθών ατόμων. Τα νεογνά είναι σε κίνδυνο για σοβαρή συστηματική νόσο όπως ηπατική νέκρωση , μυοκαρδίτιδα και νεκρωτική εντεροκολίτιδα , εκ των οποίων μηνιγγίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα , είναι συνήθως ένα μέρος.

8. Εξέλιξη των εντεροϊών

Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη γενετική και βιολογική ποικιλομορφία των εντεροϊών είναι δύο : 1) οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιού και 2) ο γενετικός ανασυνδυασμός [9].

8.1 Μεταλλάξεις

Όπως όλοι οι RNA ιοί , έτσι και οι εντεροϊοί χαρακτηρίζονται από την συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων που συμβαίνουν λόγω του υψηλού ποσοστού ενσωμάτωσης λαθών της ιικής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης των λαθών αυτών (μηχανισμός proof – reading). Η απουσία ενός μηχανισμού ελέγχου της RNA πολυμεράσης για την

πιστότητα της αντιγραφής του ιικού RNA οδηγεί σε ρυθμούς μεταλλάξεων πολύ μεγαλύτερους από αυτούς που παρατηρούνται κατά την αντιγραφή του DNA από τις αντίστοιχες DNA πολυμεράσες . Η συχνότητα λάθους υπολογίστηκε περίπου 10^{-4} έως 10^{-5} ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής [9]. Η μεγάλη συχνότητα λαθών της RNA πολυμεράσης οδηγεί στη δημιουργία ετερογενών πληθυσμών. Ο όρος *quasi – species* (σχεδόν είδος) έχει εισαχθεί για να περιγράψει το φαινόμενο της ύπαρξης μιας μεγάλης ομάδας συσχετιζόμενων γονιδιωμάτων , που έχουν γενικά μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων , αλλά διαφέρουν μεταξύ τους σε μια ή περισσότερες περιοχές [94].

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού είναι πιο συντηρημένη και παρουσιάζει μικρότερη ποικιλομορφία σε σχέση με την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες. Οι καψιδιακές πρωτεΐνες (συγκεκριμένα η VP1 , VP2 και VP3) εξελίσσονται πιο γρήγορα λόγω της ισχυρής εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή [74]. Για αυτό το λόγο , οι καψιδιακές πρωτεΐνες οι σημαντικότεροι παράγοντες της εξέλιξης των εντεροϊών , σε σύγκριση με την 5' – UTR , η οποία παρουσιάζει τους χαμηλότερους ρυθμούς εξέλιξης.

8.2 Ανασυνδυασμός

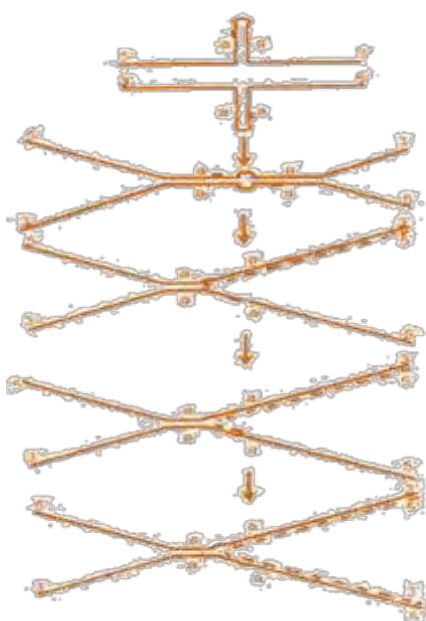
Ο γενετικός ανασυνδυασμός , δηλαδή η ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών μορίων RNA , παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε μολυσμένα κύτταρα με πολιοϊό [95] . Άλλα γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν βρεθεί και σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών [96]. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από τον βαθμό ομολογίας των πατρικών κλώνων RNA [1]. Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στον γενετικό ανασυνδυασμό , Α) ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας [97] και Β) ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης [98].

A) Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (αντιγραφικός μηχανισμός)

Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό , η 3D πολυμεράση ξεκινά τη σύνθεση ενός ιικού RNA και ξαφνικά σταματά , αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ένα άλλο ιικό RNA. Ο τερματισμός της επιμήκυνσης του αρχικού ιικού RNA οφείλεται στο ότι η 3D πολυμεράση συναντά κάποιο εμπόδιο και αποδεσμεύεται. Το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια δευτεροταγής δομή RNA [99] , είτε η προσθήκη λάθος νουκλεοτιδίου στο νεοσυντιθέμενο ιικό RNA [100].

B) Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (μη αντιγραφικός μηχανισμός)

Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό , τα μόρια του RNA κόβονται σε κάποια σημεία και τα εκτεθειμένα τους άκρα ενώνονται. Με άλλα λόγια , ένα ανασυνδυασμένο γονιδίωμα προκύπτει από τη σύνδεση τμημάτων RNA που προέρχεται από τη διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων [98].



Εικόνα 8: Σχηματική Αναπαράσταση του μηχανισμού αλλαγής μήτρας [99].

B. ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός ενός πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη μιας Stem Loop Mediated Reverse Transcription PCR για τον εντοπισμό χαμηλής συγκέντρωσης αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών , παρουσία υψηλής συγκέντρωσης μη αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Στελέχη Εντεροϊών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin1 σε συγκεντρώσεις [1] και [10⁶] TCID₅₀.

Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός Καταχώρησης
PV-1 Sabin	(LSc, 2ab)	V01150

Πίνακας 1.1.1: Πρότυπο εμβολιακό στέλεχος

2. Ενοφθαλμισμός δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες

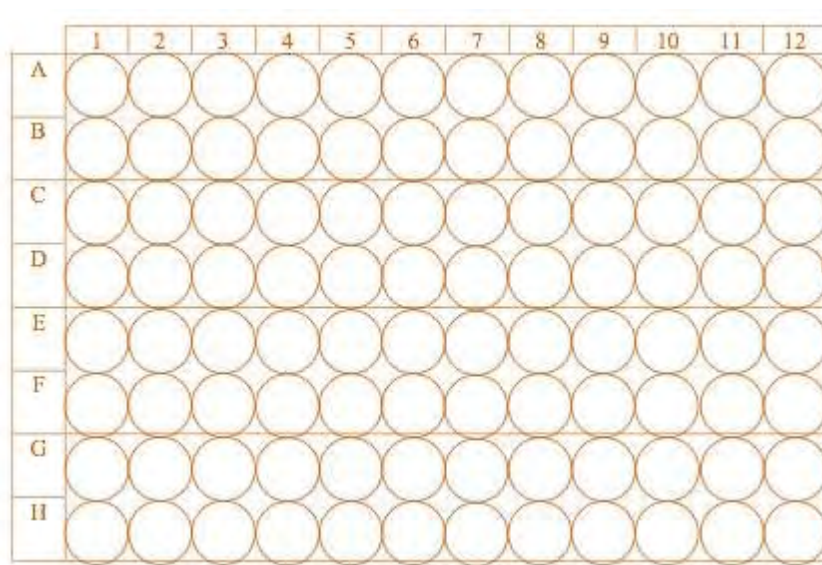
Αρχικά 100μl από το πρότυπο στέλεχος ενοφθαλμίστηκαν σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιεργείων που περιείχαν κύτταρα Rd ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό D-MEM. Οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιεργείων παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα Rd μη μολυσμένα ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό D-MEM με 2% ορό). Στη συνέχεια, ακολούθησαν αρκετές ανακαλλιέργειες του ιού με σκοπό την αύξηση του ιικού τίτλου, έτσι ώστε να εμφανίζεται πλήρης καταστροφή των κυττάρων 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Τέλος, οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιεργείων διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της μέτρησης του ιικού τίτλου του ιού.

3. Μέτρηση ιικού τίτλου και σειριακές αραιώσεις

Ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Η μέτρηση του ιικού τίτλου γίνεται με τον υπολογισμού

της τιμής TCID₅₀. Το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστέθηκαν 100μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στην πλάκα, για κάθε υικό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10⁻⁸. Στη συνέχεια, 100μl από κάθε αραιώση του ενοφθαλμίστηκαν στην πλάκα και αυτή τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C. Η παρακολούθηση της πλάκας για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης έγινε σε καθημερινή βάση, μέχρι την παρατήρηση καταστροφής των κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα (περίπου 4-5 ημέρες). Έπειτα έγινε η μέτρηση του TCID₅₀.



Εικόνα 9 : Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Οι στήλες 11 και 12 αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες.

4. Αδρανοποίηση , μόλυνση κυττάρων και απομονώσεις

Αδρανοποιήθηκαν 400 µl από τον sabin1 ιό, στις συγκεντρώσεις $[10^6]$ και $[1]$ TCID₅₀ σε θερμοκρασίες 90°C και 82°C. Για την επίτευξη της διαδικασίας αυτής ακολούθησε η θέρμανση αυτών στο μηχάνημα της PCR Primus 25 , για 30 min .

Στη συνέχεια για τη μόλυνση , κύτταρα RD αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό D – MEM και μετά την αδρανοποίηση του ιικού στελέχους sabin1 συγκέντρωσης $[10^6]$ πραγματοποιήθηκε μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας με τα αδρανοποιημένο στέλεχος με 200 µl σε κάθε σωλήνα. Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C ενώ παράλληλα γινόταν καθημερινή παρακολούθηση για την εμφάνιση κυτταρικών αλλοιώσεων (CPE).

Πραγματοποιήθηκε δεύτερη και τρίτη ανακαλλιέργεια αδρανοποιημένου ιού, με παράλληλη καθημερινή παρακολούθηση για κυτταρικές αλλοιώσεις και εφόσον δεν παρατηρήθηκε CPE κατά τη διάρκεια των επόμενων πέντε ημερών για την κάθε ανακαλλιέργεια αντίστοιχα, ακολούθησε απομόνωση διαχωρίζοντας το υπερκείμενο των σωλήνων από τα κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν οι σωλήνες με τα κύτταρα για να ξεκινήσει η διαδικασία των παρακάτω τεχνικών βάση των οποίων εξακριβώνεται η αδρανοποίηση. Οι τεχνικές αυτές θα περιγραφούν παρακάτω αναλυτικά :

- Εκχύλιση RNA
- Αντίστροφη μεταγραφή
- PCR
- Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR .

Μετά το πέρας της αδρανοποίησης ακολούθησε συμμόλυνση αδρανοποιημένου ιού sabin1 $[10^6]$ TCID₅₀ και ενεργού sabin1 $[1]$ και $[10]$ TCID₅₀ παράλληλα σε σωλήνες επιστρωμένους με RD κύτταρα , έχοντας πλέον ως σκοπό τον εντοπισμό χαμηλής συγκέντρωσης sabin1 ενεργού ιού παρουσία υψηλής συγκέντρωσης sabin1 αδρανοποιημένου ιού. Γι'αυτό και σχεδιάστηκαν οι ακόλουθες συμμολύνσεις στις ακόλουθες συγκεντρώσεις και χρησιμοποιήθηκαν :

- $[10^6]$ TCID₅₀ αδρανοποιημένος sabin1 ιός + $[1]$ TCID₅₀ ενεργός
- $[10^6]$ TCID₅₀ αδρανοποιημένος sabin1 ιός + $[10]$ TCID₅₀ ενεργός
- RD κύτταρα + $[1]$ TCID₅₀ ενεργός
- RD κύτταρα + $[10]$ TCID₅₀ ενεργός
- RD κύτταρα (μάρτυρας)

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση των σωλήνων στους 37°C και 2h μετά τη συμμόλυνση ακολούθησε πλύση, δηλαδή απόρριψη του θρεπτικού των σωλήνων και αντικατάσταση με 2ml D-MEM χωρίς προσθήκη FBS, προκειμένου να απομακρυνθούν όσα ιοσωμάτια δεν μπόρεσαν να προσδεθούν στους κυτταρικούς υποδοχείς και κατ' επέκταση να εισέλθουν στα κύτταρα. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 διαφορετικές απομονώσεις , δηλαδή έγινε διαχωρισμός του υπερκείμενου από τα κύτταρα στις 12 , 24 και 48 ώρες αντίστοιχα για κάθε μια από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ιού. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε σε tube των 2 ml σε περίπτωση ξεχωριστής μελέτης και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη στους - 20 °C και οι σωλήνες με τα κύτταρα από όλες τις απομονώσεις χρησιμοποιήθηκαν για να ξεκινήσει η διαδικασία των τεχνικών :

- Εκχύλιση RNA – extraction με kit Qiagen RNA - easy
- Αντίστροφη μεταγραφή – RT Stem Loop , όπου ο εκκινητής EntNS4 – RT στοχεύει τον αρνητικό κλώνο
- PCR με ειδικούς εκκινητές : i) EntNS2F , ο οποίος στοχεύει πάνω στον εκκινητή της RT και ii) UC53flap Universal , ο οποίος πιάνει όλους τους εντεροϊούς
- Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR

5. Εκχύλιση RNA

- Για την εκχύλιση του RNA χρησιμοποιήθηκε το « kit RNAeasy » της Qiagen και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του πρωτοκόλλου που αυτό περιείχε:
- Στους σωλήνες με τα κύτταρα των απομονώσεων προστέθηκαν 700μl D-MEM χωρίς προσθήκη FBS και μεταφέρθηκε όλη η ποσότητα σε eppendorf των 2ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 8000 rcf .

- Μετά τη φυγοκέντρηση δημιουργήθηκε ίζημα κυττάρων και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 350μl buffer RLT για το σπάσιμο των κυττάρων. Ακολούθησε ομογενοποίηση με vortex για 1 λεπτό.
- Προστέθηκαν άλλα 350μl αιθανόλης (70%) και ακολούθησε ξανά vortex των δειγμάτων για 1 λεπτό.
- Μεταφέρθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή 700μl από το διάλυμα του προηγούμενου βήματος σε μια ειδική στήλη με ένα erpendorf συλλογής 2ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 8.000 rcf και έπειτα τοποθετήθηκε η στήλη σε ένα νέο erpendorf και απομάκρυνση του erpendorf , με το φιλτραρισμένο διάλυμα.
- Προστέθηκαν 700μl Buffer RW1 στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8.000 rcf για 15 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα καθαρό erpendorf των 2ml και απομακρύνθηκε το erpendorf, με το φιλτραρισμένο διάλυμα.
- Προστέθηκαν 500μl Buffer RPE στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8.000 rcf για 15 δευτερόλεπτα.
- Η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα καθαρό erpendorf των 2ml και προστέθηκαν πάλι 500μl RPE και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8000 rcf για 2 λεπτά.
- Μετά τη φυγοκέντρηση η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf των 2ml και ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε full speed στις 14000 rcf.
- Η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα νέο erpendorf και στη συνέχεια προστέθηκαν 50μl ddH₂O RNA-easy και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8.000 rcf για 1 λεπτό.
- Μετά την φυγοκέντρηση η στήλη απομακρύνεται και το erpendorf με το RNA των δειγμάτων είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί ή να αποθηκευτεί στην κατάψυξη στους – 20 °C για μελλοντική χρήση.

7. Αντίστροφη Μεταγραφή

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι θετικής πολικότητας RNA, θα πρέπει να προηγηθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA, ώστε να ακολουθήσει η ενίσχυση με PCR συγκεκριμένων περιοχών του γενώματος του ιού.

Σε PCR tubes των 500 µl προστέθηκαν 5 µl RNA (από κάθε δείγμα) και 7 µl από το μείγμα (M1), το οποίο περιείχε :

- εκκινητή EntNS4 RT (50 pmol)
- 2mM dNTPs και
- 5 µl ddH₂O

Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και επώστηκαν στους 65°C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή. Το βήμα πραγματοποιείται για την αποδιάταξη του μονόκλωνου RNA, καθώς σε θερμοκρασία δωματίου το μόριο αυτό παρουσιάζει διάφορες διαμορφώσεις έτσι ώστε να αποκτήσει την ελάχιστη δυνατή ελεύθερη ενέργεια .

Αμέσως μετά την επώαση, τα PCR tubes τοποθετήθηκαν στον πάγο και προστέθηκε το δεύτερο μείγμα (M2). Το M2 περιείχε :

- 4 µl (1X) First strand Buffer
- 2 µl (0,01mM) DTT
- 1 µl ddH₂O
- 0,5 µl RNase out (20U /µl) καθώς και
- 0,5 µl (100U) ένζυμο RT Superscript II της Invitrogen

Αφού προστέθηκαν 8µl του δεύτερου μείγματος, ακολούθησε φυγοκέντρωση και επώαση αρχικά στους 42°C για 50 min και μετά στους 70 °C για 15 min.

8. PCR

Μετά την παραγωγή του cDNA, ακολουθεί η ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος των ιών με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων με τη τεχνική Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Η τεχνική αυτή επιτυγχάνει τον πολλαπλασιασμό μιας γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μετά από 30-40 κύκλους. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι :

- EntNS2F CGT TCC CCG CCG TCC CTG
- UC53 Flap 588nt- AAT AAA TCA TAA TTG TCA CCA TAA CCA GCC A -606nt

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μείγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: dNTPs 1mM, MgCl₂ 1.25mM, Invitrogen Taq Buffer 1X, EntNS2F 50pmol/μl , UC53 Flap 50pmol/μl, 2 Units ενζύμου Invitrogen Taq DNA Polymerase και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες:

1 κύκλο	3 λεπτά στους 94°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλους	30 δευτερόλεπτα στους 94 °C για την αποδιάταξη του cDNA. 30 δευτερόλεπτα στους 55°C για τον υβριδισμό των εκκινητών 30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	2 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

9. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Η εξέταση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζουμε ποιοτικά εάν ενισχύθηκε η περιοχή του DNA που μας ενδιαφέρει και εξακριβώνουμε ότι δεν πολλαπλασιάστηκαν, παράλληλα, μη ειδικά τμήματα DNA.

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή αгарόζης σε συγκέντρωση 2,0%. Συγκεκριμένα 0,80g αгарόζης και 40ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) αναμίχθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Έπειτα, ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αгарόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

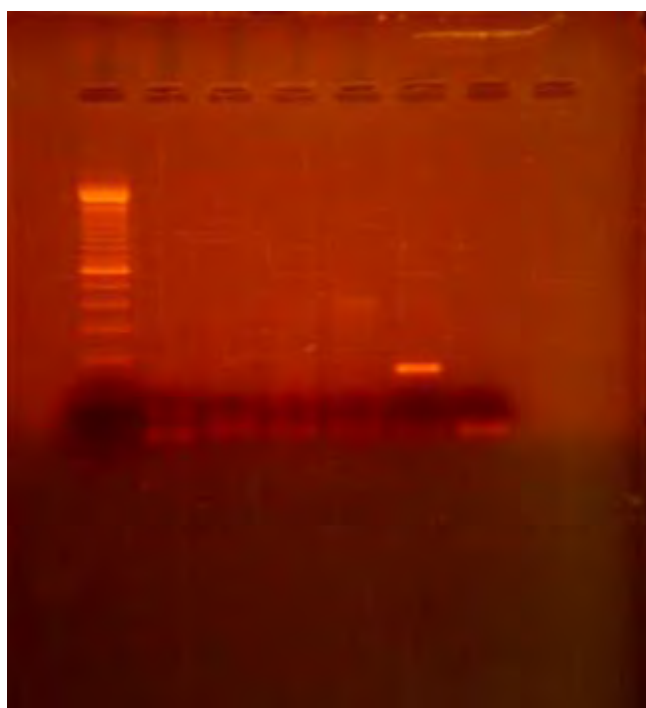
Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αгарόζης, 10μl προϊόντος της PCR αναμιγνύονται με 2 μl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στην πηκτή ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts. Το πήκτωμα αгарόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας Stem Loop Mediated Reverse Transcription PCR για τον εντοπισμό αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών παρουσία υψηλής συγκέντρωσης μη αντιγραφικά ενεργών

εντεροϊών. Αρχικά για να ελέγξουμε αν όντως έχει γίνει αδρανοποίηση μετά την θέρμανση σε αυτές τις δυο θερμοκρασίες 90 και 82 °C για τις συγκεντρώσεις [1] και [10⁶] TCID₅₀ του στελέχους Sabin1, πραγματοποιήθηκε στο τρίτο πέρασμα (P3) μια RT με τον EntNS4-RT ο οποίος είναι ένας ειδικός stem-loop εκκινητής για τον αρνητικό κλώνο και PCR με το ζεύγος εκκινητικών μορίων EntNS2-f/UC53-flap από όπου και διακρίναμε ότι η αδρανοποίηση ήταν επιτυχής καθώς δεν φάνηκε η ύπαρξη του αρνητικού κλώνου. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται το αποτέλεσμα της PCR για την αδρανοποίηση των συγκεντρώσεων [1] και [10⁶] TCID₅₀ του στελέχους Sabin1 στις ακόλουθες θερμοκρασίες του πειράματος:

L 1 2 3 4 5 6



cDNA	Primers EntNS2F Uc53flap	
S1[1] 90°C	1	-
S1[1] 82°C	2	-
S1[10 ⁶] 90°C	3	-
S1[10 ⁶] 82°C	4	-
S1[10 ⁶] 12h	5	+
ddH2O	6	-

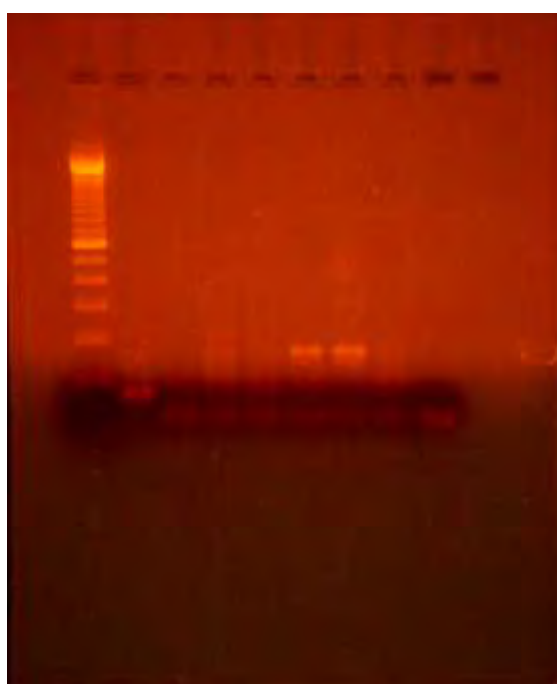
Εικόνα11: Αποτελέσματα PCR σε αδρανοποιημένα στελέχη Sabin 1 μετά από θέρμανση σε [1] και [10⁶] TCID₅₀ στους 82 & 90 °C. Η PCR πραγματοποιήθηκε μετά από το τρίτο πέρασμα (P3). Δεν ανιχνεύεται η ύπαρξη του αρνητικού κλώνου. Στην θέση 5 όπου ανιχνεύεται ο αρνητικός κλώνος είναι η θέση του θετικού μάρτυρα της PCR.

Αφού επιβεβαιώθηκε η αδρανοποίηση ακολούθησε συμμόλυνση από τον αδρανοποιημένο Sabin1 ιό [10^6] TCID₅₀ στους 82°C και τον ενεργό Sabin1 [1] TCID₅₀, και πάλι με τις ίδιες τεχνικές ως ανωτέρω.

Καταφέραμε να ανιχνεύσουμε έναν ενεργό ιό παρουσία 10^6 αδρανοποιημένων ιών και αυτό 48h μετά τη μόλυνση. Γνωρίζουμε από παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου ότι ο αρνητικός κλώνος για το [1] TCID₅₀ ενεργό ανιχνεύεται 48h μετά τη μόλυνση. Η διαδικασία της RT και PCR επαναλήφθηκε και για τον [10] TCID₅₀ ενεργό όπου είχαμε την ίδια εικόνα.

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται το αποτέλεσμα της PCR της θετικής ζώνης του αρνητικού κλώνου μετά τη συμμόλυνση από αδρανοποιημένο sabin1 [10^6] TCID₅₀ και ενεργό sabin1 [1] TCID₅₀ στις ακόλουθες απομονώσεις :

L 1 2 3 4 5 6 7 8



cDNA	Primers entNS2f Uc53flap	
Sabin1 [1] 12h	1	-
Sabin1 [1] + 10^6 αδραν 12h	2	-
Sabin1 [1] 24h	3	-
Sabin1 [1] + 10^6 αδραν 24h	4	-
Sabin1 [1] 48h	5	+
Sabin1 [1] + 10^6 αδραν 48h	6	+
Rd	7	-
ddH ₂ O	8	-

Εικόνα 12: Ανίχνευση αρνητικού κλώνου μέσω RT-PCR μετά από συμμόλυνση Sabin1 αδρανοποιημένου [10^6] TCID₅₀ και ενεργού Sabin1 [1] TCID₅₀ 48 h μετά τη μόλυνση.

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος *Enterovirus*. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας.

Οι εντεροϊοί, ανήκουν στους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο παγκοσμίως [102]. Σχετίζονται με διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο, οι οποίες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων το οποίο κυμαίνεται από ασυμπτωματικές μολύνσεις έως και σοβαρές ασθένειες. Συγκεκριμένα παραδείγματα αποτελούν: το κοινό κρουστικό, η ασθένεια των χεριών, των ποδιών και του στόματος (HFMD), οξεία χαλαρή παράλυση, άσηπτη μηνιγγίτιδα και μυοκαρδίτιδα [103,104]. Η μετάδοση των εντεροϊών πραγματοποιείται κυρίως μέσω του στόματος και των κοπράνων[105]. Η επαφή με νερό, φαγητό και χώμα με μολυσμένα κόπρανα, μπορεί να οδηγήσει στη μετάδοση μέσω της κοπρανο - στοματικής οδού[105,106]. Όπως, αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι εντεροϊοί συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Έτσι, μπορούν να κυκλοφορούν αθόρυβα μέσα σε έναν πληθυσμό με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος για πιθανές εξάρσεις. Ωστόσο η ύπαρξη απλά του γονιδιώματος ενός εντεροϊού δεν σημαίνει απαραίτητα και την ενεργότητά του, για αυτό κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη μίας μεθόδου που να μπορεί να διακρίνει τους ενεργούς εντεροϊούς από τους μη ενεργούς εντεροϊούς.

Για τη διάγνωση των μολύνσεων από εντεροϊούς κατά κανόνα χρησιμοποιούνται οι κυτταροκαλλιέργειες, αλλά μέχρι και σήμερα εντοπίζεται η αδυναμία κάποιων στελεχών των εντεροϊών να αναπτυχθούν σε αυτές. Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή είναι πολύ χρονοβόρα, ακριβή και όχι τόσο πρακτική. Έχουν αναπτυχθεί πλέον μοριακές τεχνικές ανίχνευσης των εντεροϊών, όπως για παράδειγμα νέες εκδοχές PCR, RT-PCR που όμως κάθε μία από αυτές τις μεθόδους έχει και τα δικά της μειονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, ο εξοπλισμός που απαιτείται για την ανίχνευση

μέσω αυτών των τεχνικών είναι αρκετά ακριβός. Έτσι, είναι αναγκαίο να αναπτυχθούν νέες μοριακές τεχνικές οι οποίες να είναι γρήγορες, εύκολες και χαμηλού κόστους [107,108,109].

Σε αυτή την εργασία έγινε προσπάθεια για το σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη μίας γρήγορης, εύκολης, ευαίσθητης και υψηλής εξειδίκευσης τεχνικής Stem Loop Mediated Reverse Transcription PCR στην οποία στόχος ήταν ο εντοπισμός αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών παρουσία υψηλής συγκέντρωσης μη αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών.

Για αυτό το σκοπό σχεδιάστηκαν δύο εκκινητές, όπου ο ένας εκ των δύο σε αυτή την μέθοδο είναι ένας stem-loop εκκινητής (RT-primer) , ο οποίος διαθέτει μια δομή στελέχους-θηλιάς στο 5'-άκρο και μια ειδική ιική αλληλουχία στο 3'-άκρο. Ο άλλος εκκινητής που χρησιμοποιείται μετέπειτα στην PCR είναι σχεδιασμένος με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να δεσμεύεται πάνω στην δομή στελέχους θηλιάς αυτού του ειδικού RT-primer , προσδίδοντας με αυτόν τον τρόπο υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία στη μέθοδο αυτή για την ανίχνευση του αντιγραφόμενου αρνητικού κλώνου.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν sabin1 [10^6] TCID₅₀ αδρανοποιημένου ιού, sabin1 [1] TCID₅₀ ενεργού ιού, καθώς και Rd κύτταρα. Ακολούθησε αδρανοποίηση μέσω θέρμανσης η οποία ήταν επιτυχής καθώς στο τρίτο πέρασμα δεν ανιχνεύθηκε ο αρνητικός κλώνος. Στη συνέχεια κατόπιν συμμόλυνσης αδρανοποιημένου sabin1 ιού και ενεργού, 2h μετά τη μόλυνση ακολούθησε πλύση προκειμένου να απομακρυνθούν όσα ιοσωμάτια δεν μπόρεσαν να προσδεθούν στους κυτταρικούς υποδοχείς και κατ' επέκταση να εισέλθουν στα κύτταρα. Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση των κυττάρων στις 12 , 24 και 48 h και ανιχνεύθηκε θετική ζώνη του αρνητικού κλώνου στις 48 h μετά τη μόλυνση.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την εγκυρότητα της τεχνικής καθώς με βάση την παραπάνω μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε διαπιστώθηκε ότι ακόμη και ένας αντιγραφικά ενεργός ιός Sabin1 [1] TCID₅₀ να υπάρχει παρουσία Sabin1 [10^6] TCID₅₀ αδρανοποιημένων ιών, μπορεί να ανιχνευθεί ο αρνητικός του κλώνος.

Συμπεραίνεται ότι οι θερμοκρασίες αδρανοποίησης προκαλούν μεταβολές στη στερεοδιαμόρφωση του καψιδίου του ιού με συνέπεια την επακόλουθη εμφάνιση προβλημάτων πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα και την απώλεια της μολυσματικότητας του εντεροϊού [110]. Παρόλα αυτά ακόμα και ένας αντιγραφικά ενεργός ιός να υπάρχει παρουσία πολλών μη αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών μπορεί να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα και αυτό γιατί μέθοδοι θερμικής αδρανοποίησης των εντεροϊών όπως και άλλοι μέθοδοι που έχουν την δυνατότητα να καθιστούν τον ιό αντιγραφικά ανενεργό ,έχουν εφαρμογές στη παραγωγή εμβολίων.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) Fields Virology, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
2. Michael J. Adams, Elliot J. Lefkowitz, Andrew M. Q. King, Balázs Harrach, Robert L. Harrison, Nick J. Knowles, Andrew M. Kropinski, Mart Krupovic, Jens H. Kuhn, Arcady R. Mushegian et al., (2017) Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses, Arch. of Virol., 162: 2505 – 2538
3. Knowles, N.J., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R. (2012). Picornaviridae. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, pp 855-880.
4. Mirand, A.; Henquell, C.; Archimbaud, C.; Peigue-Lafeuille, H.; Bailly (2007) J. Emergence of echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. J. Gen. Virol., 88: 166–176.
5. Oberste M. S., Maher K., and Pallansch M. A. (2004) Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. J. Virol. 78: 855-67.
6. Sawyer M. H. Enterovirus infections: diagnosis and treatment, (1999), Pediatr Infect Dis J 18:1033–1039.
7. Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Hovi, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and ICTV Report Consortium, (2017) [ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae](#), Journal of General Virology, 98: 2421–2422.
8. Rueckert R. R.(1985) Picornaviruses and their replication. In Virology, New York, Raven Press (ed. B. N. Fields): 705 –738
9. Stanway G. (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. J. Gen. Virol. 71(11): 2483 – 2501.
10. Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM. (1969) The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. Proc Natl Acad Sci U S A, 62: 912–919.

11. Minor P. D., Ferguson M., Evans D. M., Almond J. W., and Icenogle J. P. (1986) Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol*, 67: 1283-1291.
12. Blondel B., G. Duncan, T. Couderc, F. Delpeyroux, N. Pavio and F. Colbere-Garapin (1998) Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J. Neuro Virol*, 4: 1-26.
13. Blondel B, Autret A, Brisac C, Martin-Latil S, Mousson L, Pelletier I, Estaquier J, Colbere-Garapin F. *Front Biosci* (2009) Apoptotic signaling cascades operating in poliovirus-infected cells. (Landmark Ed). Review Jan 1 , 14: 2181-92.
14. Melnick J. L. (1990) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B. N.): 549-60
15. Flanagan JB, Petterson RF, Ambros V, et al. (1977) Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* , 74: 961-965.
16. Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al. (1977) A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 74: 59-63
17. Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, et al. (1977) The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*, 268: 208-213.
18. Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA (1978) *J Virol* , 27: 357-365
19. Stanway G., Hughes P. J., Mountford R. C., Minor P. D. and Almond J.W. (1984) The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.* 12(20): 7859 – 7875
20. Palmenberg A. C. (1987) Picornaviral processing: some new ideas. *J. Cell Biochem.* 33(3): 191–198 80
21. Melchers W. J., Zoll J., Tessari M., Bakhmutov D. V., Gmyl A. P., Agol V. I., and Heus H. A. (2006) A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus oriL by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA. *RNA* 12(9): 1671–1682

22. Kauder S. E. and Racaniello V. R. (2004) Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* 113(12): 1743–1753
23. Principles of Virology Jane Flint, Vincent R. Racaniello, Glenn F. Rall, Anna Marie Skalka eISBN-13: 9781555819521.ASM Press 2015. Vol I, (2):26 , (5):127,146 , (6):353,365
24. Toyoda H., Nicklin M. J., Murray M. G., Anderson C. W., Dunn J. J., Studier F. W. and Wimmer E. (1986) A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell.* 45:761-70.
25. Marcotte L. L., Wass A. B., Gohara D. W., Pathak H. B., Arnold J. J., Filman D. J., Cameron C. E., and Hogle J. M.(2007) Crystal Structure of Poliovirus 3CD Protein: Virally Encoded Protease and Precursor to the RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Virol.* 81:3583-3596.
26. Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B.A., and Pallansch M.A.(1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37:1288-93.
27. Jurgens C. K., Barton D. J., Sharma N., Morasco B. J., Ogram S. A., and Flanagan J. B.(2006) 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology.* 345:346-357
28. Park, N., Katikaneni P., Skern T., and Gustin K. E. (2008) Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirusinfected cells, *Journal of Virology*,vol. 82, no. 4, pp. 1647–1655.
29. Cuconati, A., W. Xiang, F. Lahser, T. Pfister, and E. Wimmer (1998) A Protein Linkage Map of the P2 Nonstructural Proteins of Poliovirus. *J. Virol.* 72:1297-1307
30. Madan V., Castelló A., and Carrasco L., (2008) Viroporins from RNA viruses induce caspasedependent apoptosis. *Cellular Microbiology* 10:437–451.
31. Bienz K., Egger D., Troxler M., and Pasamontes L., (1990) Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J. Virol.* 64:1156-63
32. Teterina N. L., Levenson E., Rinaudo M. S., Egger D., Bienz K., Gorbalenya A. E., and Ehrenfeld E. (2006) Evidence for Functional Protein Interactions Required for Poliovirus RNA Replication. *J. Virol.* 80:5327-5337.
33. Pfister T., and Wimmer E. (1999) Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 274: 6992-7001.

34. Li J. P. and Baltimore D. (1990) An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating effect. *J. Virol.* 64:1102 - 1107.
35. Paul A. V., Mugavero J., Molla A., and Wimmer E. (1998) Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implications for proteolytic processing. *Virology* 250(1): 241–253
36. Belov G. A., Bonnet N. A., Kovtunovych G., Jackson C. L., Lippincott-Schwartz J., and Ehrenfeld E.(2007) Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *J. Virol.* 81:558-567.
37. Towner J. S., Brown D. M., Nguyen J. H. C., and Semler B. L. (2003) Functional conservation of the hydrophobic domain of polypeptide 3AB between human rhinovirus and poliovirus. *Virology.* 314:432-442
38. Doedens J. R., Giddings T. H. Jr, and Kirkegaard K. (1997) Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* 71:9054-64.
39. Richards O. C., and Ehrenfeld E. (1998) Effects of poliovirus 3AB protein on 3D polymerase-catalyzed reaction. *J. Biol. Chem.* 273:12832-12840
40. Molla A., Harris K. S., Paul A. V., Shin S. H., Mugavero J., and Wimmer E. (1994) Stimulation of poliovirus proteinase 3C_{pro}-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J. Biol. Chem.* 269:27015-27020.
41. Kuyumcu-Martinez N. M., M. E. Van Eden, P. Younan, and R. E. Lloyd (2004) Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. and Cell. Biology* 24(4):1779-1790.
42. Pfister T., and Wimmer E. (1999) Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 274: 6992-7001
43. Weidman M. K., Sharma R., Raychaudhuri S., Kundu P., Tsai W., and Dasgupta A. (2003) The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res.* 95:75-85.
44. Melnick J. L. (1996) "Fields Virology." 3rd Ed., PA: Lippincott/Raven, Philadelphia
45. Rohll J. B., Moon D. H., Evans D. J., and Almond J. W. (1995) The 3'untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J. Virol.* 69: 7835-44

46. Todd S., Nguyen J. H., and Semler B. L. (1995) RNA-protein interactions directed by the 3' end of human rhinovirus genomic RNA. *J. Virol.* 69:3605-14.
47. Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao (1993) Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
48. Rossmann M. G. (1994) Viral cell recognition and entry. *Protein Sci.* 3:1712-1725.
49. Selinka Hans-Christoph, Michael Huber, Andreas Pasch, Karin Klingel, Christian Aepinus, Reinhard Kandolf. (1998) Department of Molecular Pathology, Institute for Pathology, University of Tübingen, Liebermeisterstr. 8, D-72076 Tübingen, Germany
50. Yongning H., Chipman R. P., Howitt J., Bator M. C., Whitt A. M., Baker S. T., Kuhn J. R., Anderson W. C., Freimuth P., and Rossmann G. M. (2001) Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nature Structural Biology* 8:874 –878.
51. Shaukat Kahn, Xiaozhong Peng, Jiang Yin, Ping Zhang, Eckard Wimmer, (2008) *Journal of Virology*. July 2008 , p. 7167 – 7179.
52. Bergelson J. M., Chan M., Solomon K. R., St John N. F., Lin H., and Finberg R. W. (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 6245-6248.
53. Racaniello V. Picornaviridae (2007): The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins; p. 796-830.
54. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. (1989) Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56:855-865.
55. Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J. (2002) Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 10(7): 324-331.
56. Koike S, Taya C, Kurata T, et al., (1991) Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 951-955.
57. Racaniello VR, Baltimore D. (1981) Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* , 214:916-919.

58. Fricks CE, Hogle JM. (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 64:1934-1945.
59. Ambros V, Baltimore D. (1980) Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem* 255:6739-6744
60. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al., (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 291: 547-55
61. Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, et al., (2000) Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 74: 6570-6580.
62. Egger D., Bienz K. (2002) Recombination of poliovirus RNA proceeds in replication complexes originating from distinct replication starts. *J. Virol.* 76(21): 10960-10971.
63. Bienz K, Egger D, Pasamontes L., (1987) Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology.* 160:220–226.
64. Cho MW, Teterina N, Egger D, et al., (1994) Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 202:129-145
65. Echeverri AC, Dasgupta A. (1995) Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 208:540-553.
66. Murray K.E., and Barton D.J. (2003) Poliovirus CRE – dependent VPg uridylylation is required for positive – strand RNA synthesis but not for negative – strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(8):4739-4750.
67. Novak JE, Kirkegaard K. (1991) Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* 65:3384-3387.

68. Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al. (2000) Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 74: 10371-10380.
69. Paul AV, Rieder E, Kim DW, et al., (2000) Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 74:10359-10370.
70. Yin J, Paul AV, Wimmer E, et al., (2003) Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol* 77:5152-5166.
71. Gamarnik AV, Andino R. (1998) Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 12(15):2293–2304
72. Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. (1993) Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.
73. Hunter, P.R. (1998) *Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology*. John Wiley and Son Ltd, Chichester, UK
74. Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G. M., and van Loon A. M. (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1): 202-227
75. Brown E. H. (1972) Enterovirus Infections. *British Medical Journal.* 2:169-171
76. Grimwood K., Huang S. Q., Sadleir G. L., Nix A. W., Kilpatrick D. R., Oberste M. S., and Pallansch M. A. (2003) Acute Flaccid Paralysis from Echovirus Type 33 Infection. *J. Clin. Microb.* 41:2230-2232.
77. Mena, I., Perry, C.M., Harkins, S., Rodriguez, F., Gebhard, J. and Whitton, J.L. (1999) The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *American Journal of Pathology*, 155:1205-1215
78. Chan K. P., Goh K. T., Chong C. Y., Teo E. S., Lau G., and Ling A. E. (2003) Epidemic Hand, Foot and Mouth Disease Caused by Human Enterovirus 71, Singapore. *Emerging Infectious Diseases.* 9:78-85
79. Oberste M. S., Maher K., Schnurr D., Flemister R. M., Lovchik C. J., Peters H., Sessions W., Kirk C., Chatterjee N., Fuller S., Hanauer J. M. and Pallansch A.M. (2004)

Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enterovirus and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* 85:2577-2584

80. Baboonian C., Davies M. J. Booth J. C., and McKenna W. J. (1997) Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 223: 31-52

81. Dotta F., Censini S., van Halteren A. G., Marselli L., Masini M., Dionisi S. Mosca F., Boggi U., Muda A. O., Prato S. D., Elliott J. F., Covacci A., Rappuoli R., Roep B. O., and Marchetti P. (2007) Coxsackie B4 virus infection of β cells and natural killer cells insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *PNAS* 104:5115-5120

82. Williams C. H., Oikarinen S., Tauriainen S., Salminen K., Hyöty H., and Stanway G. J. (2006) Molecular analysis of an echovirus 3 strain isolated from an individual concurrently with appearance of islet cell and IA-2 autoantibodies. *Clin. Microbiol.* 44:441-8.

83. Hammon W (1955) " Passive immunization against poliomyelitis ". *Monogr Ser World Health Organ* 26:357-70.

84. Rinaldo C (2005). "Passive Immunization Against Poliomyelitis: The Hammon Gamma Globulin Field Trials, 1951-1953". *Am J Public Health* 95(5):790-9. doi:10.2105/AJPH.2004.040790.

85. Más Lago P, Cáceres VM, Galindo MA, Gary HE Jr, Valcarcel M, Barrios J, Sarmiento L, Avalos I, Bravo JA, Palomera R, Bello M, Sutter RW, Pallansch MA, de Quadros CA. (2001) Persistence of vaccine-derived poliovirus following a mass vaccination campaign in Cuba: implications for stopping polio vaccination after global eradication. *Int J Epidemiol.* 30(5):1029-34

86. Minor PD., Pipkin PA, (1998) Studies on the loss of infectivity of live type 3 poliovaccine on storage. *Biologicals.* 26(1):17-23.

87. Rotbart HA. (2002) Treatment of picornavirus infections. *Antiviral Res.* 53(2):83-98.

88. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, et al., (1987) Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 160:311-322.

89. Kew O, De L, Yang C-F, et al., (1993) The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res* p. 215-246.

90. Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, et al., (1995) Molecular epidemiology of polioviruses. In: Kew OM, Nathanson N, eds. *Molecular Epidemiology. Seminars in Virology*, Vol 6. New York: Academic Press , p. 401-414.

91. Lipskaya G, Chervonskaya EA, Belova GI, et al., (1995) Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol* 76:1687 - 1699.
92. Mulders MN, Lipskaya GY, van der Avoort HG, et al., (1995) Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis* 171:1399-1405
93. Zheng DP, Zhang LB, Fang ZY, et al., (1993) Distribution of wild type 1 poliovirus genotypes in China. *J Infect Dis* 168:1361-1367.
94. Domingo E., Martinez – Salas E., Sobrino F., de la Torre J. C., Portela A., Ortin J., Lopez – Galindez C., Perez – Brena P., Villanueva N., Najera R., et al., (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance – a review. *Gene* 40(1):1-8
95. Hirst G. K. (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27:303-309
96. Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Ivanova O. E., Koroleva G. A., Hinkkanen A. E., Ilonen J. (2005) Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* 86(12): 3281-3290
97. Kirkegaard K., and Baltimore D. (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47(3): 433-443
98. Gmyl A. P., Belousov E. V., Maslova S. V., Khitrina E. V., Chetverin A. B., and Agol A. I. (1999) Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.* 73(11): 8958-8965
99. Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Viktorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., and Agol V. I. (1986) The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology* 155(1):202-213
100. Pilipenko E. V., Gmyl A. P., and Agol V. I. (1995) A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 23(11): 1870-1875

101. Anwar, A., August, J.T., Too, H.P., (2006). A stem-loop mediated reverse transcription real time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. *Analytical Biochemistry* 352(1):120-128.
102. Khetsuriani N, LaMonte-Fowlkes A, Oberste MS, Pallansch MA. (2006) Enterovirus surveillance - United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ.* 55:1-20.
103. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. (2009) Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *Virol J.* 6:149. doi: 10.1186/1743-422X-6-149.
104. Pallansch MA, Roos RP. (2001) Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Press, *Virol* 4:723-775
105. Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M. (2008) Enteroviruses in water environment-a potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med.* 15:199-203
106. Lee HK, Jeong YS. (2004) Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol.* 70:3632-3636. doi: 10.1128/AEM.70.6.3632-3636.2004
107. Hymas WC, Aldous WK, Taggart EW, Stevenson JB, Hillyard DR. (2008) Description and validation of a novel real-time RT-PCR enterovirus assay. *Clin Chem.* 54:406-413. doi: 10.1373/clinchem.2007.095414.
108. Hu X, Zhang Y, Zhou X, Xu B, Yang M, Wang M, Zhang C, Li J, Bai R, Xu W, Ma X. (2012) Simultaneously typing nine serotypes of enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease by a GeXP analyzer-based multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 50:288-293. doi: 10.1128/JCM.05828-11
109. Pusch D, Ihle S, Leubhn M, Graeber I, Lopez-Pila JM. (2005) Quantitative detection of enteroviruses in activated sludge by cell culture and real-time RT-PCR using paramagnetic capturing. *J Water Health.* 3:313-324.
110. Dean O. Cliver. (2009) Capsid and Infectivity in Virus Detection. *Food Environ Virol.* 1(3-4):123-128.

